

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



**EFEITO DE DIFERENTES TEMPERATURAS DE
ARMAZENAMENTO NA QUALIDADE DE MOLUSCOS
BIVALVES VIVOS**

Joana Paula Marques Pinheiro Torres

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

Outubro 2011

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



**EFEITO DE DIFERENTES TEMPERATURAS DE
ARMAZENAMENTO NA QUALIDADE DE MOLUSCOS
BIVALVES VIVOS**

Joana Paula Marques Pinheiro Torres

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

Doutora Sónia Pedro, Instituto de Investigação das Pescas e do Mar,
IPIMAR

Professora Doutora Deodália Dias, Faculdade de ciências da Universidade de
Lisboa

Outubro 2011

Agradecimentos

Muitos foram aqueles que contribuíram para o alcance desta nova etapa da minha vida. Gostaria, assim, de manifestar o meu grande apreço e gratidão...

À minhas orientadoras, Doutora Sónia Pedro, pelo delineamento do trabalho, pelas aprendizagens, apoio constante ao longo deste percurso, e Professora Doutora Deodália Dias.

Ao IPIMAR nomeadamente à Engenheira Leonor Nunes coordenadora da U-VPPA , pelo fornecimento da amostra e toda a logística.

Ao Sr. António Almeida do “Sindicato Livre dos pescadores e profissões afins” pela simpatia e fornecimento da amostra.

À Patrícia Oliveira por toda a amizade, boa disposição constante no laboratório, ensinamentos, e predisposição para ajudar.

À Doutora. Helena Silva pelos ensinamentos e predisposição para ajudar sempre que preciso.

À Doutora Amparo Gonçalves pela ajuda durante todo o ensaio prático e fornecimento de dados.

À Doutora Fernanda Martins, Doutora Helena Lourenço, Margarida Muro do laboratório de bromatologia da U-VPPA, pelos ensinamentos e apoio numa das fases do ensaio.

Às minhas colegas de mestrado, pelas partilhas e aprendizagens vividas. Especialmente à Ana Sofia Pinto, por ter feito todo o percurso comigo no IPIMAR, e à Mariana Correia que não me deixou dormir enquanto não acabasse de escrever a tese.

À Bárbara Teixeira por toda a disposição e ajuda na parte estatística do ensaio.

À Susana e ao Geremias pelas boas vindas no laboratório e constante boa disposição.

A todos os meus amigos, pela amizade e carinho que sempre manifestaram. Obrigada por me terem dado a mão, mais uma vez, enchendo este percurso de significado. Em especial á Joaquina por ter ficado acordada até quando eu precisei para me orientar e suportar, e à Filipa por me ter convencido a seguir este caminho em Lisboa e estar sempre presente quando me vi nas situações mais variadas.

À minha mãe, às minhas irmãs e irmão a quem devo tudo o que sou, por acreditarem sempre em mim, e estarem presentes sempre que preciso.

Resumo

A amêijoia-macha (*Venerupis pullastra*) é um dos bivalves mais consumidos em Portugal. No presente estudo foi avaliada a qualidade microbiológica desta amêijoia capturada na Trafaria através do controle do pH e da contagem de microorganismos indicadores de poluição fecal, tais como *Enterobacteriaceae* e indicadores de degradação como as bactérias ácido-lácticas, microrganismos viáveis totais e bactérias produtoras de H₂S. A amêijoia foi armazenada a diferentes temperaturas (4°C, 9°C), e avaliou-se a sua qualidade microbiológica e química (através das técnicas acima referidas) ao longo do tempo nestas temperaturas. Determinou-se que seria benéfico a utilização da temperatura 4 °C para períodos de armazenamento superiores a 2 dias.

Palavras-chave: moluscos bivalves, amêijoia-macha , temperatura, armazenamento, qualidade microbiológica.

Abstract

Clams (*Venerupis pullastra*) are one of the most consumed bivalves in Portugal. In the present investigation the chemical and microbiological quality, of the clam captured in Trafaria, was evaluated by control of pH and of the count of fecal pollution indicators, such as *Enterobacteriaceae* and spoilage indicators like acid lactic bacteria, total count of viable microorganisms and H₂S producing bacteria . Clams were stored at different temperatures (4°C and 9°C), and its chemical and microbiological quality was evaluated (through the techniques above) over time given the varying temperatures. It was determined that it would be beneficial to use the temperature of 4 °C for storage periods longer than 2 days.

Key words: shellfish, clams, temperature, storage, microbiological quality.

Introdução.....	1
1. Preâmbulo	1
2. Biologia dos Moluscos Bivalves	2
3. Ameijoa-macha (<i>venerupis pullastra</i>)	4
3.1 História	4
3.2 Ciclo de Vida	5
4. Consumo de moluscos bivalves e o seu valor nutricional.....	6
5. Principais riscos do consumo de bivalves	7
5.1 Contaminantes microbiológicos.....	8
5.2 Contaminantes biológicos.....	8
5.3 Contaminantes químicos.....	9
6. Zonas de Produção (Classificação)	10
6.1 Classificação de zonas	10
7. Artes da pesca e Apanha	11
7.1 Artes da pesca	11
7.2 A apanha.....	12
8. Controlo de Qualidade	13
8.1 Índices microbiológicos	13
8.1.1 Indicadores de degradação	14
8.1.1.1 Contagem de microrganismos viáveis totais.....	14
8.1.1.2 Bactérias produtoras de H ₂ S.....	15
8.1.1.3 Bactérias ácido-lácticas	15
8.1.2 Indicadores de poluição fecal.....	16
8.1.2.1 Enterobactereaceae	16
8.2 Índices Químicos	17
8.2.1 pH	17
8.2.2. ABVT	17
Objectivos.....	19
Material e Métodos.....	20
Resultados e Discussão	25
9. Resultados microbiológicos.....	25
9.1 Contagem de microrganismos viáveis totais (CTV (30°C)).....	25

9.2	Contagem de microrganismos viáveis totais (CTV (22°C))	28
9.3	Pesquisa de bactérias Ácido-láticas	30
9.4	Contagem de bactérias produtoras de sulfureto de hidrogénio (H ₂ S).....	32
9.5	Contagem de Enterobacteriaceae.....	34
10.1	pH	36
Conclusões		38
Perspectivas Futuras		40
Bibliografia		41
Anexo I.....		1

Introdução

1. Preâmbulo

O consumo de alimentos, nomeadamente o de produtos da pesca, tem sido condicionado ao longo dos tempos, devido não só à sua disponibilidade, mas também a factores culturais e religiosos. Contudo, no que diz respeito aos bivalves, muito poucas são as comunidades que colocam restrições ao seu consumo. Em Portugal, embora o consumo *per capita* seja inferior a 5Kg/pessoa/ano, os bivalves são muito apreciados, fazendo parte da gastronomia tradicional de algumas regiões e de alguns pratos emblemáticos (Nunes e Campos , 2008).

Os moluscos bivalves são capazes de filtrar grandes volumes de água para obter nutrientes e oxigénio. No entanto, dada a sua localização, nomeadamente, em zonas lagunares, estuarinas e costeiras, frequentemente próximas de centros urbanos, estes podem ser vectores de diversos agentes nocivos. Entre estes salientam-se os contaminantes químicos, tais como mercúrio, cádmio e chumbo; e os contaminantes biológicos, como bactérias, vírus, parasitas e microalgas produtoras de biotoxinas. (Silva, 2011). Pelo que se referiu, é impreterível que estes organismos, colhidos em meio natural e destinados à alimentação humana, respeitem exigências e normas sanitárias em todas as fases da cadeia de produção e distribuição, de forma a garantir a sua salubridade. Em particular, salienta-se a importância de realizar o controlo das condições em que estes são armazenados industrialmente e a nível doméstico.

O presente estudo insere-se neste contexto, pretendendo determinar qual o efeito da temperatura de armazenamento na qualidade microbiológica e química de bivalves vivos.

O presente trabalho encontra-se estruturado nas componentes teórica e empírica. A primeira parte incide numa sucinta revisão bibliográfica na qual será explorada com especial ênfase a biologia, consumo, artes da pesca e apanha, principais riscos, e zonas de produção de moluscos bivalves. Ainda inscrita nesta temática, história, ciclo de vida e características específicas da amêijoia-macha. Por último descritos índices microbiológicos e químicos do controlo de qualidade. Num segundo momento, é apresentado o estudo propriamente dito. Expõem-se inicialmente os objectivos da investigação, seguindo-se da metodologia utilizada, apresentação dos

resultados e sua discussão. Finalmente, são apresentadas as conclusões, seguidas de uma reflexão acerca de futuras perspectivas que poderiam incrementar o presente estudo.

2. Biologia dos Moluscos Bivalves

É designado molusco bivalve, aquele que possui corpo mole protegido por uma concha de duas valvas (exosqueleto), que se articulam por uma espécie de dobradiça (chamada charneira), estas valvas mantêm-se unidas devido á presença dos músculos adutores (fig 1). Nestes moluscos (bivalves) não é possível distinguir uma cabeça, o seu corpo é constituído principalmente por um pé e um conjunto de lâminas branquiais, podendo ter ou não a presença de sífões. Os músculos adutores situam-se em cada uma das extremidades do animal, a sua retracção faz com que as valvas fechem.

As valvas estão cobertas pelas duas abas assimétricas que dão forma ao manto. A retracção dos músculos adutores faz com que estas valvas se mantenham estritamente fechadas sendo este o processo responsável pela abertura e fecho das valvas em substituição de um sistema muscular que controle este processo. Ou seja quando os músculos retraem as valvas mantêm se fechadas, o relaxamento destes resulta na abertura das mesmas através de um ligamento elástico. Ao longo da charneira existe uma espécie de cremalheira que mantém as valvas da concha no lugar o que evita que se desloquem para trás e para a frente. (IPIMAR, 2008)

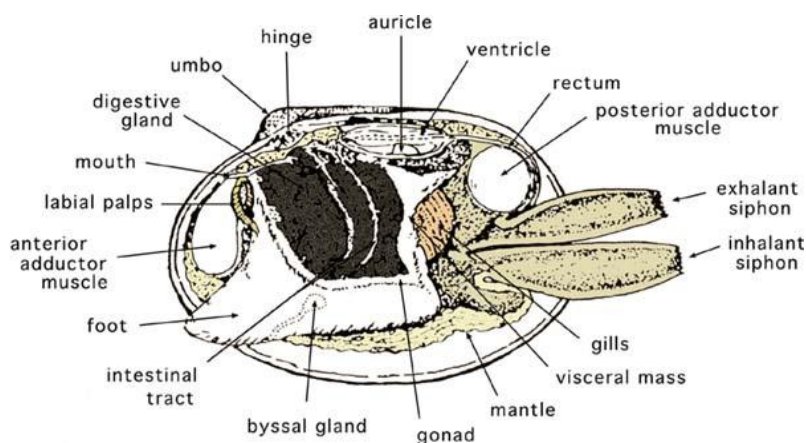


Figura 1: Esquema da constituição de uma ameijoia. <http://www.fao.org/docrep/007/y5720e/y5720e07.htm>

Os bivalves alimentam-se de fitoplâncton, contendo desde bactérias, protistas, diatomáceas, ovos e larvas de todo o tipo de invertebrados, que obtêm através da filtração de grandes volumes de água. A água entra na cavidade paleal através do sífão inalante, banha as brânquias (local onde o alimento fica retido) e volta a sair através do sífão exalante. A respiração é dada também através da água, as trocas

gasosas (assim como o processo de alimentação) dão-se então ao nível das brânquias.(Castilho, 2010)

Depois do processo da filtração (ajudado pelos cílios presentes nas brânquias) o alimento que ficou retido nas brânquias é levado até á boca através de uma secreção viscosa, este alimento vai então ser digerido ao longo do trato digestivo. Algum deste alimento digerido aglomera-se na glândula digestiva, o alimento não digerido envolvido em muco, forma as fezes do animal, que são então expelidas pelo ânus.(Silva, 2011)

Os moluscos bivalves podem ser caracterizados de acordo com dois tipos de alimentação. Temos assim os filtradores ou suspensívoros que, como o nome indica se alimentam de partículas em suspensão na água, sendo que nos moluscos que vivem enterrados na areia os seus sifões vêm até á superfície para que consigam filtrar a água. E os detritívoros que se nutrem de resíduos de matéria orgânica que se encontram em decomposição sobre os sedimentos.(IPIMAR,2008)

Os bivalves são espécies que podemos encontrar em qualquer tipo de água desde a doce à salgada, sendo as marinhas as mais utilizadas, ocupam zonas por todo o mundo e de diversas profundidades. Vivem tanto fixos a substratos como livres ou apenas debaixo de areia. Os bivalves que fazem parte da dieta do ser humano são encontrados essencialmente pelas zonas intermarés e de pouca profundidade.

A sobrevivência e qualidade de vida destes animais dependem de vários factores ambientais e de natureza biológica, sendo que a sua distribuição geográfica acaba então por depender da influência que estes factores têm na sua vida. Como factores ambientais que afectam os bivalves podemos considerar a salinidade, a temperatura, a quantidade de oxigénio dissolvido na água, a luz, entre outros (Castilho, 2010) Se virmos o caso da temperatura, podemos dizer que se esta aumentar o metabolismo acelera também, ou que induz um aumento dos movimentos dos cílios, logo existe uma maior quantidade de água e rapidez na sua entrada, ou que vai aumentar também o ritmo respiratório do molusco. A temperatura afecta também o relaxamento do músculo adutor, sendo que o músculo relaxa completamente (e em consequência verifica-se a abertura máxima das valvas) por volta dos 20 °C a actividade branquial é quase nula entre 3 °C e 8 °C e atinge o seu máximo de rendimento entre os 25 °C e os 30°C. Podemos assim constatar a importância destes parâmetros no seu funcionamento biológico.(IPIMAR, 2008)

Como factores biológicos podemos evidenciar a importância da presença de parasitas que podem causar danos fisiológicos no animal, a presença de animais competidores, e claro a quantidade de alimento disponível na água que consomem.

Segundo Gonçalves et al , 2009 amêijoas armazenadas em atmosferas enriquecidas com oxigénio diminuem o metabolismo prolongado a sua viabilidade. Fazendo deste modo com que haja uma diminuição do normal crescimento de microrganismos ou bactérias patogénicas ao longo do tempo de armazenamento. Podendo deste modo este tipo de atmosfera ser utilizado como um complemento ao armazenamento de bivalves vivos para que este possa ser prolongado com melhor qualidade.

3. Ameijoa-macha (*venerupis pullastra*)

A amêijoa macha (*venerupis pullastra*) é dos bivalves moluscos mais consumidos em Portugal e por isso este foi o molusco bivalve escolhido como material de estudo deste projecto.

Esta amêijoa, com uma dimensão de 50 mm em média, tem uma concha oval alongada um pouco frágil. As suas valvas possuem estrias radiais concêntricas muito finas e irregulares (esta forma das estrias distingue-as das outras espécies) em geral salientadas na zona posterior (IPIMAR, 2008). Os seus estádios de crescimentos são bem definidos e claros. Os sifões estão ligados ao longo de todo o comprimento da concha; esta característica distingue esta espécie da, sua tão similar, amêijoa boa (*Ruditapes decussatus*) (FAO, 2011)

Vive enterrada na areia, lodo ou cascalho em zonas intramarés de 0 a 20 m e até 40 m de profundidade (IPIMAR, 2008).

3.1 História

A captura de *Venerupis pullastra* dá-se principalmente em Portugal, Espanha, França e Itália.

Em Espanha o, prematuro, grande consumo de moluscos no século XVI é principalmente de ostras e muito raramente de amêijoas, mas pela mesma altura existem referências da venda de amêijoas em Portugal como noutros sítios.

A intensa captura de amêijoas começou entre os anos de 1926 e 1927. A procura era indiscriminada, e os pescadores utilizavam ferramentas proibidas e pescavam amêijoas de todos os tamanhos (FAO,2011).

Apesar das grandes colheitas do molusco, a sua capacidade de repovoamento era rápida. Estima-se que em 1948,as populações de amêijoa-boas (*Ruditapes*

decussatus) e amêijoa-macha (*Venerupis pullastra*) na Ria del Burgo (Espanha) recuperaram em menos de um ano a captura de uma densidade populacional de 1-5 a 30-50 amêijoas/m². (Figueras, 1957).

Em 1956, a produção de molusco da região galega da Espanha correspondeu a cerca de 60 % da produção nacional. Nesse altura (que durou de Outubro a Março), 250 barcos de pesca pescaram bivalves perto de San Simón na ria de Vigo, Cada barco a pescar uma média de 10 a 12 kg de *V. pullastra* por dia (2 500 kg no total). Ao mesmo tempo em áreas mais perto da boca da baía cerca de 60 embarcações obtiveram 3 000 kg/dia. Esta grande diferença pode se associar á grande mortalidade de amêijoas que se deu na parte interna da ria de Vigo, devido a fortes chuvas que provocaram uma rápida queda na salinidade (Ferreira, 1988).

Nos anos que se seguiram, a produção de moluscos variou bastante e são poucos os dados estatísticos sobre a produção total. No entanto, a pesca constante das populações naturais levou a uma redução das populações naturais. De 1985 a 1986, a produção de amêijoas, *V. pullastra* e *V. rhomboideus*, de captura e cultura, foi cerca de 1 700 toneladas.(FAO, 2011).

3.2 Ciclo de Vida

Este animal é unissexual, tendo os sexos separados (mas por vezes, apesar de raramente são encontrados hermafroditas (FAO,2011) e normalmente as fêmeas possuem maiores dimensões que o macho. Libertam os ovos e os espermatozóides na coluna de água onde ocorre a fecundação. Normalmente a primeira postura ocorre logo no primeiro ano de vida bentónica. Factores externos como a quantidade e qualidade de alimento disponível na água e a temperatura podem ter influência no início e duração da gametogénese. O período de postura dura vários meses desde o início da Primavera ao final do Verão. Após este período os animais ficam um pouco debilitados existindo por isso um período de descanso a nível sexual até Fevereiro havendo uma consequente acumulação de produtos de reserva (Banha, 1948) e um menor crescimento do molusco bivalve (existindo assim dois períodos de crescimento, sendo o período mais activo de Março a Outubro, e o menos activo de Novembro a Fevereiro, dependendo sempre das condições ambientais podem acabar por variar um pouco dentro do normal em cada um dos meses)(IPIMAR, 2008) .A fecundação dá-se na água e a incubação dura aproximadamente 10 a 12 dias (este é mais uma fase do ciclo da amêijoa influenciado pela temperatura). Desenvolve-se então a larva e aproximadamente 48 horas mais tarde vai se formando a concha bivalve. Com o

término do período larvar (com uma duração média de 2 a 4 semanas) inicia-se a metamorfose que dará às larvas a sua forma definitiva do molusco bivalve.

Os índices de crescimento vão diminuindo ao longo da sua vida, sendo que o limite do crescimento acaba por ser definido pelas condições do meio (principalmente a disponibilidade do alimento e a temperatura). (Matias, 2007)

A melhor fase de captura dos moluscos bivalve é no Outono e no Inverno, pois é uma fase mais estável para estes animais visto que durante a Primavera e o Verão estão na fase de desova e postura o que resulta numa menor condição física. (IPIMAR, 2008)

4. Consumo de moluscos bivalves e o seu valor nutricional

Os moluscos bivalves têm um importante papel na nossa indústria, pois representam uma parte significativa da pesca nacional, tanto pela produção como pelo número de pessoas que dependem da apanha e comercialização para a sua subsistência (IPIMAR, 2008).

Em Portugal são comercializadas à volta de 16 espécies diferentes de bivalves vivos procedentes das zonas de produção.

Estes animais são preferencialmente adquiridos, pelo consumidor, vivos mas a procura do produto em congelado e enlatado tem vindo a aumentar devido à comodidade que oferecem estas opções para a sua conservação (Bandarra, 2004)

Apesar de não haver um consumo muito elevado de moluscos bivalves (consumo *per capita* inferior a 5Kg/pessoa/ano), este tem vindo a aumentar para algumas espécies.

Em Portugal, os moluscos bivalves são muito apreciados, fazendo eles parte integrante da gastronomia típica portuguesa. (Nunes e Campos, 2008).

O interesse por estes animais deve-se também ao seu valor nutricional. No quadro 1 podemos encontrar uma compilação da composição química e valor energético médios da parte edível (conjunto do miolo e líquido intervalvar) dos moluscos bivalves, que são considerados os de maior interesse comercial.

Quadro 1

Valores médios da composição química aproximada e do valor energético das espécies de moluscos bivalves de maior interesse comercial a nível nacional. (IPIMAR,2008, p.39)

Produto (100 g)	Energia (Kcal/Kj)	Água (g)	Proteína (g)	Gordura (g)	Minerais (g)	Hidratos de carbono (g)
Amêijoas	74/310	81,8	12,8	1,0	1,9	2,6
Mexilhões	86/360	80,6	11,9	2,2	1,6	3,7
Ostras	81/339	82,1	9,4	2,3	1,2	4,9
Vieiras	105/440	74,6	17,1	0,8	1,6	6

5. Principais riscos do consumo de bivalves

Apesar da sua composição química e das suas vantagens e benefícios, o consumo de bivalves têm também alguns riscos associados, estes riscos advêm da quantidade de contaminantes que estão associados aos locais onde os moluscos bivalves habitam, sendo que estes podem ser contaminantes microbiológicos, biológicos e químicos. O tipo de alimentação filtradora destes animais acaba por ser a responsável pelo seu perigo de contaminação (Castilho, 2010). Tendo em conta que os moluscos bivalves são consumidos inteiros (não eviscerados) e semi-crus (pois se forem submetidos a um prolongado tempo de cozedura ficam com uma consistência semelhante a borracha e tornam-se desagradáveis de consumir) o risco de contágio aumenta por parte de agentes patogénicos pois estes acabam por não poder ser totalmente eliminados pela temperatura e tempo de cozedura. Este facto leva-nos á importância de existir um apertado controle de qualidade garantindo a segurança e salubridade do produto. (Codex alimentarius Comission – CAC, 2003)

5.1 Contaminantes microbiológicos

A contaminação microbiológica das águas conquícolas (e por consequência dos moluscos bivalves) pode resultar da actividade urbana, agro-industrial e de lazer. As fontes de contaminação fecal podem ser de dois tipos, difusas ou pontuais tendo principalmente uma origem humana e/ou animal.

Dentro das fontes de contaminação pontuais devem ser salientados os efluentes de estação de tratamento de águas residuais, o lixo de origem industrial, inundações de esgotos combinados, fossas e explorações animais. Descargas de barcos, sarjetas, prados, quintas, reservas naturais, florestas, pântanos, são considerados focos de poluição difusa. (IPIMAR,2008)

A existência de microrganismos no meio aquático, a partir de fontes de contaminação, depende de vários factores humanos e ambientais, tais como a topologia dos terrenos, a pluviosidade e as características hidrográficas. A pluviosidade é factor que tem mais influência da contaminação do meio aquático sendo que esta pode chegar a influenciar na classificação do estatuto do local.

Como contaminantes microbiológicos são considerados três grandes grupos, são eles: as bactérias, os vírus entéricos, e os protozoários (Criptosporídeos e Giárdias).(IPIMAR,2008)

5.2 Contaminantes biológicos

O oceano e marés possuem uma enorme variedade de organismos de todas formas e dimensões. Alguns desses organismos possuem dimensões tão reduzidas (microscópicas) que são levados e transportados pelas correntes marinhas de uns locais para outros. Sendo estes organismos a constituição do plâncton (planktos = que são transportados), que se divide em fitoplâncton e zooplâncton. As microalgas (pertencentes ao fitoplâncton) são então a base da cadeia alimentar marinha, pois, estas utilizam a luz solar e dióxido de carbono para produzir matéria orgânica (se forma semelhante ao que fazem as plantas terrestres). (Whittle, 1977) .O fitoplâncton é, por isso, produtor de uma grande parcela do oxigénio presente na atmosfera terrestre, e serve também de alimento para o zooplâncton, pequenos peixes, algumas espécies de baleias e bivalves.

O fitoplâncton tem por vezes uma multiplicação rápida e excessiva que se deve a variações nas condições ambientais (seja por causas naturais ou de origem antropogénica). Estas proliferações são normalmente designadas como *blooms*. Por

norma estes *blooms* são benéficos mas por vezes este aumento exponencial de microalgas pode se prejudicial ao nível económico para a aquacultura, pesca e turismo, devido ao facto de algumas destas espécies serem produtoras de toxinas prejudiciais á saúde humana.(IPIMAR,2008) Estes *blooms* prejudiciais são normalmente designados por HAB (Harmful algal blooms) e podem dividir-se em três tipos dependendo das espécies de algas fitoplanctónicas intervenientes: espécies produtoras de toxinas que podem ser introduzidas na cadeia alimentar, provocando perturbações gastro-intestinais,neurológicas e amnésicas; espécies não tóxicas que originam grandes concentrações de matéria orgânica, que podem mesmo provocar a alteração da cor da água do mar, cuja degradação ocasiona condições de anoxia que origina a morte de peixes e invertebrados; espécies não tóxicas mas prejudiciais para invertebrados e peixes, que provocam danos ou colmatagem das brânquias.

As toxinas libertadas podem provocar a morte de alguns animais ou manter-se acumuladas nos bivalves e nos peixes, tornam-se especialmente perigosas pois estas toxinas são resistentes ao calor utilizado na cozedora destes animais podendo causar sérios problemas de saúde humana.(Hallegraef et al, 1995)

5.3 Contaminantes químicos

Outra forma de contaminação das águas (e por consequência dos organismos que nelas habitam) é por contacto com substâncias orgânicas e inorgânicas. De entre estas substâncias químicas evidenciam-se alguns metais considerados não essenciais (por não se conhecer nenhuma função metabólica) como por exemplo o alumínio, bismuto, cádmio, chumbo, lítio e mercúrio. Quantidades não apropriadas destes elementos no organismo podem provocar alterações nos sistemas nervoso central, hematopoiético, cardiovascular ou respiratório. Algumas destas substâncias podem ter implicações para os seres vivos até ao nível cancerígeno e mutagénico.

Estes contaminantes são distribuídos no ambiente pelos ciclos biogeoquímicos. A bioacumulação ocorre durante estes ciclos quando a taxa de ingestão do poluente excede a taxa de eliminação. Esta bioacumulação nas plantas e nos animais leva á incorporação destes metais na cadeia alimentar.(IPIMAR, 2008)

Ao contrário das outras substâncias tóxicas, os metais não podem ser sintetizados ou destruídos pelo ser humano, porém este ao utilizá-los e manipulá-los interfere no seu grau de toxicidade. Quer por transporte ambiental, quer pela produção de compostos que não existiam naturalmente e que apresentam toxicidade superior á do produto existente na natureza.

Através de estudos efectuados sobre o grau de exposição do Homem a esses elementos e do conhecimento dos teores de metais tóxicos nos vários produtos da pesca tem sido possível quantificar as doses admissíveis e definir os teores máximos permitidos nos géneros alimentícios.(UE, 2006, 2008)

6. Zonas de Produção (Classificação)

Como já foi referido o consumo de bivalves pode trazer riscos para a saúde pública, e para que haja um controle da qualidade dos bivalves existe um programa de monitorização no qual se determina a qualidade das zonas lagunares e litorais portuguesas. Esta monitorização tem como foco três parâmetros: o controlo microbiológico, e detecção de fitoplâncton tóxico, determinação dos níveis de biotoxinas marinhas e metais tóxicos nos bivalves.

6.1 Classificação de zonas

Para se fazer uma caracterização das zonas é necessária uma avaliação das fontes e tipos de contaminação fecal (humana e animal) no espaço que rodeia os locais de produção, em conjunto com a monitorização de microrganismos indicadores de poluição fecal (como por exemplo *Escherichia Coli*). Este conjunto de informações torna possível fazer um cálculo do risco de contaminação dos bivalves por microrganismos patogénicos para cada zona. Ficando determinado por cada zona o potencial de utilização para a produção de moluscos bivalves e o tipo de tratamento após-captura a que têm de ser sujeitos para que sejam considerados confiáveis para o consumo humano.

Os resultados são afectados principalmente pela frequência e momento de amostragem (um dos factores que pode influenciar neste caso é por exemplo a pluviosidade), localização dos pontos de amostragem, as espécies amostradas.

Esta classificação está então dividida em três estatutos sanitários: Estatuto A (com um teor de *Escherichia Coli* por 100 gramas de carne e liquido intervalvar (TEC/100) inferior ou igual a 230), no qual os bivalves podem ser apanhados e comercializados para consumo humano directo; Estatuto B (com um TEC/100 de 230 a 4600, em pelo menos 90 % das amostras, sem nenhuma exceder um TEC/100 de 46000) em que os bivalves podem ser apanhados e destinados a depuração, transposição ou transformação em unidade industrial; Estatuto C (com um TEC/100 de 4600 a 46000) Os bivalves podem ser apanhados e destinados a transposição

prolongada ou transformação em unidade industrial. A partir de um TEC/100 de 46000 a captura de bivalves é proibida.

Em Portugal a entidade competente para fazer a classificação das zonas de produção de moluscos bivalves é o INRB, I.P/L-IPIMAR. (IPIMAR, 2008)

7. Artes da pesca e Apanha

7.1 Artes da pesca

As artes da pesca de moluscos bivalves normalmente envolvem a pesca com embarcação ou apeeda. Estas artes são praticadas em águas interiores marítimas (de acordo com o Regulamento da Pesca por Arte de Arrasto), águas interiores não marítimas (de acordo com os regulamentos de pesca de incidência local – rios e rias) e águas oceânicas.

Na arte de arrasto incluem-se a ganchorra e ganchorra de mão (somente em águas oceânicas), berbigoeira e ganchorra a manobra com sarilho (em águas interiores não marítimas)

A ganchorra é uma arte de arrasto, rebocada por uma embarcação perto da costa ou por pescadores na zona de maré. Esta arte é considerada uma arte de arrasto de pequena ou média dimensão, sem asas, composta por uma armação metálica dotada de um pente de dentes (onde os bivalves ficam retidos) na parte inferior à qual está ligado um saco de rede. (DGPA,2006)

A pesca com ganchorra pratica-se de norte a sul do país sendo que são utilizadas as técnicas de: arrasto de cintura ou arrasto de cinta que possui uma draga manual (utilizada em zonas de areia, na maré baixa), constituída por um cabo de madeira, uma cinta e uma armação em ferro, com uma pá na parte inferior, a qual possui um saco de rede; arrasto de popa ou Vara que é uma arte de arrasto pelo fundo, rebocado com uma embarcação, constituída por uma estrutura formada por dois patins metálicos ligados a uma vara de madeira ou de ferro, a qual tem ligado um saco de rede; arrasto de mão que é composto por uma vara de madeira e por um aro de arame, que tem ligado um cone em rede. É utilizado nos bancos de areia durante a maré baixa, a partir da praia.

Esta arte de arrasto está devidamente regulamentada pelo Decreto Regulamentar nº 7/2000 de 30-05-2000, Artigo 3.º

Os limites interiores das zonas de operação estão regulamentados pela Portaria n.º 1102-E de 2000, de 22-11-2000,

Artigo 12.º,

“ 1. O exercício da pesca com ganchorra rebocada por embarcação só é permitido em profundidades superiores a 2,5 metros.

2. Sem prejuízo do disposto no número anterior, a pesca com ganchorra rebocada por embarcação não pode ser exercida a menos de 300 metros da linha de costa em áreas concessionadas, durante a época balnear. No campo ambiental temos que o uso da ganchorra, ou qualquer outra arte de arrasto, quando arrastado pelo fundo, destrói os habitats das espécies bentónicas, afectando também a produtividade das outras espécies.

Os habitats costeiros são um local fértil e propício ao acasalamento, reprodução e crescimento de muitas espécies de espécies de peixes e bivalves.” (Carvalho, 2007)

A ganchorra de mão que é utilizada na pesca apeada, é considerada de pequena dimensão e é utilizada, como diz o próprio nome, por acção da mão humana, sem auxílio de embarcação, apenas em zonas só alcançáveis na baixa-mar.

A ganchorra manobrada com sarilho é também de pequena dimensão, por acção da força manual humana é conduzida a partir da embarcação, melhorada pela acção de um sarilho. É uma arte utilizada essencialmente na captura da amêijoia-macha, em águas interiores não oceânicas no Rio Tejo de acordo com o Regulamento.

O berbigoeiro é uma arte de ocorrência local, aprovada para alguns rios, rias e lagoas. Pode ser utilizada a partir de uma embarcação para ou a pé, por pescador apeado. É uma arte constituída por uma travessa de ferro com pente de dentes, sendo que a meio tem uma vara que funciona como cabo e ligada a um arco onde encaixa o saco. As suas características específicas diferem também de acordo com as zonas em que é manobrado.(IPIMAR, 2008)

7.2 A apanha

A apanha de molusco bivalves ainda é autorizada, em águas interiores não marítimas, águas interiores marítimas e águas oceânicas de acordo com o Regulamento da Apanha (Portaria Nº 1102-B/2000). Esta é a uma actividade individual, nas zonas de capitania de área de residência, e nas limítrofes. Na apanha

de bivalves só são autorizados instrumentos, como a adriça, a faca de mariscar e o ancinho. A adriça é constituída por uma haste metálica em ponta, geralmente com uma forma cônica. O ancinho é simplesmente um conjunto de dentes fixado a um cabo. A faca de mariscar é uma lâmina mecânica, com forma variável, de bordos cortantes, fixada ou não a um cabo de madeira. Os apanhadores são autorizados ao uso de embarcações de apoio e transporte. (IPIMAR, 2008)

8. Controlo de Qualidade

Na bibliografia tem sido utilizado um largo espectro de parâmetros para avaliar a qualidade de bivalve (Khan et al., 2005). Os parâmetros químicos comumente utilizados para peixes têm sido aplicados para os bivalves. Dentro destes parâmetros está a determinação do teor de azoto básico volátil total (ABVT) (Goulas et al., 2005; Cao et al., 2009), proveniente da degradação, de compostos de azoto, realizada pela actividade microbiológica (Ruiz-Capillas & Moral, 2005) ou do catabolismo, *post-mortem*, de nucleótidos.

As variações de pH são geralmente medidas para ostras (Cao et al., 2009) e peixe (Tejada & Huidobro, 2002) para descrever a deterioração microbiológica. Análises bacteriológicas fornecem informações sobre o crescimento da deterioração bacteriana deterioração. A rapidez de degradação dos tecidos pode ser determinada (Cao et al., 2009b), e a análise da composição bacteriana revela a predominância de bactérias Gram positivas como *Vibrionaceae* e *Enterobacteriaceae* (Cao et al., 2009).

Bactérias representativas da deterioração e a degradação dos tecidos estão altamente relacionadas com mudanças de sabor (Boyd et al., 1980; Gram & Huss, 1996; Aaraas et al., 2004) e a qualidade do produto final pode ser avaliada através de uma avaliação sensorial para determinar o tempo máximo de armazenamento compatível com a segurança alimentar para os consumidores.

Avaliação sensorial é um procedimento demorado, que requer a mobilização de provadores treinados (Chang et al., 1998) mas é considerado por alguns autores como um dos indicadores de qualidade mais precisos (Khan et al., 2005). Geralmente dois a três critérios sensoriais são avaliados, entre eles aparência e odor (Aaraas et al., 2004).

8.1 Índices microbiológicos

Historicamente, o reconhecimento das fezes como fonte de doenças transmitidas pela água através da via fecal-oral ocorreu na Europa por volta de 1800.

Por volta de 1900 foi geralmente reconhecido que os microrganismos são indicadores da poluição fecal mais sensíveis do que medidas químicas.

A pesquisa de microrganismos foi considerada como um meio razoável para detectar a presença de contaminação fecal em águas residuais.

Os microrganismos agora usados como indicadores da contaminação fecal sendo necessariamente (mas não exclusivamente) habitantes do tracto digestivo dos seres humanos e de animais de sangue quente, e não são componentes da microbiota dominante numericamente.

A composição bacteriana das fezes dos mamíferos, que podem variar com a espécie, idade, dieta, e localização geográfica do hospedeiro, é formada predominantemente por bactérias obrigatoriamente anaérobias que incluem *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, e *Eubacterium*. Os anaérobios facultativos comensais incluem *Lactobacilli*, *Enterobacteriaceae*, e vários *cocci* pertencentes a *Enterococcus* e *Streptococcus*.

Grande parte da literatura sobre os indicadores de águas povoadas por bivalves parece ter-se desenvolvido em torno do conceito de que a poluição fecal é essencialmente derivada de grandes fontes pontuais de descargas de esgoto.

O mau funcionamento dos sistemas sépticos é apontado como a mais importante fonte de contaminação fecal.(Hackery, 1995)

Existem indicadores de degradação como os microrganismos viáveis totais, bactérias produtoras de H₂S e as bactérias ácido-lácticas.

8.1.1 Indicadores de degradação

8.1.1.1 Contagem de microrganismos viáveis totais

A contagem de microrganismos viáveis totais é um dos testes microbiológicos mais comuns a nível alimentar. Pois este dá-nos uma estimativa do número total de unidades formadoras de colónias viáveis (Hayes, 1995)

Este parâmetro é sinónimo de contagem aeróbica Total (TAC) e contagem de placa padrão (SPC). A contagem total representa, se realizada pelos métodos tradicionais, o número total de bactérias que são capazes de formar colónias visíveis num meio de cultura a uma dada temperatura. Esta contagem pode dar uma medida comparativa do grau global de contaminação bacteriana e a higiene aplicada. No

entanto, deve ter-se em conta que não existe nenhuma correlação entre a contagem total e a presença de quaisquer bactérias com importância para a saúde pública (FAO,1995)

O PCA (Plate count agar) é um dos substratos mais utilizados para a determinação da contagem total. No entanto, ao examinar vários tipos de produtos do mar, um ágar mais rico (Iron Agar) dá contagens significativamente mais elevadas do que o PCA (Trolle & Huss, 1987). Além disso, o IA também dá resultados do número de bactérias produtoras de sulfureto de hidrogénio, que em alguns produtos da pesca são as bactérias específicas da degradação.

8.1.1.2 Bactérias produtoras de H₂S

Reconhece-se que certas bactérias são a principal causa da deterioração. Diferentes substratos ricos em peptona que citrato férrico foram utilizados para detecção de bactérias produtoras de H₂S como *Shewanella putrefaciens*, que apresentam colónias pretas devido à precipitação de FeS (Levin, 1968). A deterioração é frequentemente causada por membros da família *Vibrionaceae* que também irá formar colónias pretas em IA (FAO, 1995)

8.1.1.3 Bactérias ácido-lácticas

As bactérias ácido lácticas (bal) constituem um grande grupo de bactérias Gram positivas, asporogénicas, catalase e oxidase negativos e cocos que produzem ácido láctico como o metabolito principal da fermentação de carboidratos (Françoise, 2010). As BAL são anaeróbias ou aeróbias facultativas e geralmente têm requisitos nutricionais complexos especialmente para aminoácidos e vitaminas. Os géneros compreendidos em laboratório são os *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, bem como os géneros mais abrangentes de *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Sporolactobacillus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella* e *bifidobacterium* (Tailliez, 2001). Elas estão distribuídas pela natureza e normalmente encontram-se em vários produtos alimentícios (lacticínios, carne, fruta, vegetais, etc.), assim como nas cavidades genital, intestinal e oral de animais e humanos.

Os humanos têm usado empiricamente as BAL para a fermentação natural de leite, carne, vegetais e fruta durante milhares de anos o que levou á estabilidade de um novo produto (Françoise, 2010).

Apesar de maior parte das BAL serem reconhecidas como seguras pela “US Food and Drugs administration”, tem sido relatada a implicação de algumas destas bactérias em doenças de peixes. Estas bactérias, reclassificadas como *Lactococcus garvieae*, são responsáveis por septicemias, infecções oftalmológicas e hemorragias (Baya et al, 1991; Toranzo e tal, 1993) Ao fim de determinado tempo de armazenamento, as bactérias ácido-láticas, tornam-se perdominantes, por vezes até associadas a *Enterobacteriaceae* e *Brochothrix thermosphacta* (Hansen et al 1996; Leroi, et al 2001; Cardinal et al, 2004)

8.1.2 Indicadores de poluição fecal

8.1.2.1 Enterobacteriaceae

Existem certos indicadores de poluição fecal, tais como *Enterobacteraceae* que é uma família de bactérias Gram-negativas muito abundante, que inclui uma diversa variedade de bactérias patogénicas. Os indivíduos desta família são bastante conhecidos, alguns pertencem a microbiota normal dos intestinos de seres humanos e animais como a *Escherichia coli*, outros como habitantes do solo ou da água e outros podem estar implicados em vários processos patogénicos, incluindo por exemplo os géneros *Salmonella*, *Shigella* e *Yersinia*. A espécie *Escherichia coli*, mais conhecida como *E.coli*, é a espécie que tem vindo a ser mais estudada (Almeida et al, 2004)

Todas as enterobactérias são anaeróbios facultativos e possuem exigências nutricionais simples, fermentam glicose e produzem ácido a partir dessa reacção. Estas bactérias são catalase positiva e oxidase negativa (Wagenlehner e tal, 2002) Todas as bactérias pertencentes a esta família reduzem o nitrato a nitrito e não formam esporos. A maioria das enterobactérias são móveis e com flagelos peritríquios, excepto os géneros *Klebsiella*, *Shigella* e *Yersinia*.

Enterobacter spp. pode causar infecções do trato respiratório inferior, infecções abdominais, infecções do trato urinário, infecções de tecidos moles, endocardite, , infecções do sistema nervoso central, infecções oftalmológicas assim como infecções de ossos e articulações (Sanders, 1997)

A *Enterobacter spp.* é conhecida pela sua propensão para desenvolver, durante o tratamento, resistência a alguns antibióticos, mas esta resistência só se verifica quando estes antibióticos são administrados em grandes quantidades. (Medeiros, 1997)

Por causa de sua existência nas fezes humanas, os enterococos clássicos foram sugeridos como indicadores da qualidade da água por volta de 1900. Visto que, regra geral, não se multiplicam na água, especialmente se o nível de matéria orgânica não for alto. São as vezes comparados com os coliformes como melhores indicadores pois morrem a uma taxa mais lenta do que estes. (Ostrolenk et al , 1947; Burton, 1949)

8.2 Índices Químicos

8.2.1 pH

Depois da morte do pescado dá-se uma glicólise anaeróbia, esta reacção vai originar uma acumulação de ácido láctico que reduz o pH do músculo. A quantidade de ácido láctico produzido está relacionada com a quantidade de glicogénio armazenado no tecido vivo. Em geral, o músculo dos peixes contém um nível de glicogénio relativamente baixo, logo depois da morte forma-se menor quantidade de ácido láctico, pelo que o valor de pH desce pouco.

O estado nutricional, a condição física (exercício) e o stress precedentes à morte têm efeito nos níveis de glicogénio armazenado e, conseqüentemente, no pH final do músculo após a morte. Em regra, o pescado bem nutrido e relaxado contém mais glicogénio que o pescado que não estava em boa condição física

A redução do pH do músculo do pescado após a morte tem efeito nas suas propriedades físicas. À medida que o pH decresce, a textura do músculo é afectada pela desnaturação parcial das proteínas pois estas perdem a capacidade de retenção da água. Assim, o conhecimento do valor de pH no músculo do pescado pode fornecer informação importante acerca da sua condição. Este valor vai aumentando gradualmente durante o período de conservação, devido à formação de compostos químicos, em particular compostos azotados, como resultado das reacções autolíticas e bacterianas. (Gonçalves, 2010)

Segundo Conde (1975), o pH do pescado fresco varia entre 6,6 e 6,8 e à medida que esse se deteriora os valores de pH aumentam e podem atingir 7,2.

8.2.2. ABVT

Determinação do teor de azoto básico volátil total pelo método de Conway

Um dos parâmetros importantes para se saber a qualidade do pescado é o grau de frescor. Existem metodologias físico-químicas á quais se recorre para avaliar quantitativamente o frescor do pescado.

O frescor do pescado pode então ser determinado, segundo regulamentação europeia determinando o azoto básico volátil total da amostra (ABVT). Esta determinação ajuda-nos a avaliar se o pescado está apto para consumo e a quantificar o grau de alteração, ou seja, o frescor. A determinação do pH muscular é usada por uma questão de confirmação que os valores se mantêm não muito variáveis, visto que é uma metodologia de fácil e rápida execução. (Fontes et al 2007)

A determinação do ABVT é um método que permite estabelecer objectivamente se o pescado está ou não apto para consumo . O valor de ABVT, para o pescado, a partir do qual se considera as amostras impróprias para consumo é de 35mgN/100g (Baixas-Nogueras et al., 2002).

Objectivos

De entre os vários géneros alimentícios, os moluscos bivalves são considerados de risco elevado devido ao facto de poderem ser consumidos crus ou após ligeiro tratamento térmico. Nestes produtos a qualidade está directamente ligada com a qualidade do meio ambiente onde estes estão inseridos devido às suas características fisiológicas. Uma vez que o consumo de bivalves pode representar sérios riscos para a saúde do consumidor, considera-se de extrema importância o estudo da qualidade microbiológica dos bivalves e dos índices físico-químicos e sensoriais. Neste contexto, o trabalho tem como objectivo principal determinar qual o efeito da temperatura de armazenamento na qualidade microbiológica e química de bivalves vivos (nomeadamente da amêijoa-macha).

Material e Métodos

- **Material de estudo**

O material de estudo utilizado neste projecto foi a amêijoa-macha (*Venerupis pullastra*). Para cada ensaio das variadas temperaturas capturaram-se 8 Kg de amêijoa na Trafaria - Almada (águas interiores não oceânicas no Rio Tejo). Foi utilizado o método de pesca por arrasto com ganchorra manobrada com sarilho.

- **Estabilização das funções vitais**

Depois de capturada e transportada para o Laboratório de Microbiologia do IPIMAR, a amêijoa foi colocada emersa em 9,6 L (1,2% em relação ao peso da amêijoa) de água salobra (2,5% de NaCl) durante 24 horas. Deste modo estabilizaram-se as suas funções vitais. Após 24 horas dividiu-se a amostra por sacos de rede com 250 g cada.

- **Armazenamento**

Os sacos de rede foram então armazenados à temperatura de 4 °C e retiraram-se dois sacos de amostra (amostra e duplicado) nos dias 0, 3, 5 e 7 (retiraram-se amostras apenas quando a mortalidade foi superior a 50%), para proceder às análises químicas e microbiológicas. Este procedimento foi repetido uma vez mais para a temperatura de 4 °C , e duas vezes para a temperatura de 9 °C.

- **Métodos Microbiológicos**

Seleccionaram-se e lavaram-se as amêijoas que tinham as válvulas fechadas e em bom estado. De seguida, perto da chama do bico de Bunsen , de forma a ser mantido um ambiente asséptico, iniciou-se a abertura das ameijoas cortando o músculo adutor e retirou-se e reservou-se o miolo.

- a) **Contagens totais, *Enterobactereaceae* e Bactérias produtoras de H₂S**

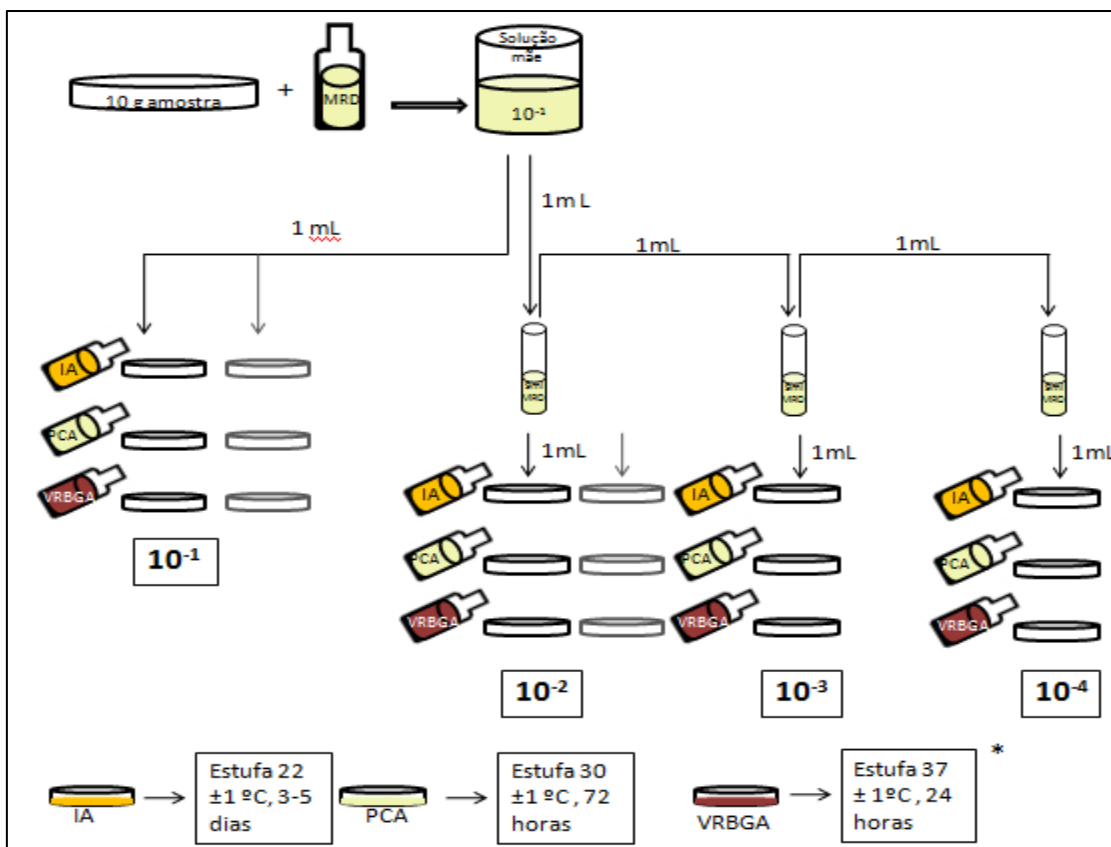


Fig 2 : Esquema do método utilizado para a contagem de Microorganismos Viáveis Totais, *Enterobacteraceae* e Bactérias Produtoras de H₂S.

Efectua-se segundo uma adaptação das ISO 6887-1(1999) , ISO 6887-3 (2003) .

Tal como o representado no esquema da fig. 2, pesaram-se 10 g da amostra para saco de homogeneizador Stomacher, juntou-se 90 ml de solução Maximum Recovery Diluent (MRD) e homogeneizou-se em Stomacher durante 60 s à velocidade normal.

Obteve-se-se deste modo a suspensão mãe (correspondente à diluição 10^{-1}).

Semearam-se 6 ml da suspensão-mãe em seis placas de Petri (1 ml em cada), e 1 ml da mesma para um tubo de ensaio com 9 ml de MRD obtendo-se assim a diluição 10^{-2} .

Adicionou-se o meio de cultura adequado fundido e arrefecido a cerca de 45 °C a cada duas placas de Petri (PCA para a contagem de microorganismos viáveis totais, VRBGA para as *Enterobacteraceae* e IA para as bactérias produtoras de H₂S).

Repetiu-se o procedimento as vezes necessárias para obter as diluições pretendidas.

Contagem de Microorganismos Viáveis Totais:

Depois de solidificados os meios, incubaram-se as placas semeadas invertidas em estufa a $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 72 horas.

Passadas as 72 horas contaram-se todas as colónias presentes nas placas que apresentavam menos de 300 colónias. O tratamento de resultados foi feito de acordo com o protocolo presente no ANEXO X.

Bactérias produtoras de H_2S :

Incubaram-se as placas semeadas invertidas em estufa a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 72 – 120 horas (3- 5 dias).

Após o tempo de incubação contaram-se as colónias presentes nas placas que apresentavam menos de 300 colónias. As colónias características de bactérias produtoras de H_2S são colónias nitidamente pretas. O tratamento de resultados foi feito de acordo com o protocolo presente no ANEXO I.

Enterobacteriaceae:

As placas de petri foram incubadas invertidas a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$.

Contaram-se como *Enterobacteriaceae* presuntivas as colónias características com 1 mm – 2 mm de diâmetro que apresentam cor violeta/rosa e halo da mesma cor.

Para a confirmação, seleccionaram-se, sempre que possível, 5 colónias características que se repicaram para meio nutritivo gelosado não selectivo (TSA). Estas placas ficaram a incubar a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$. De seguida, efectuaram-se os seguintes testes para confirmação:

Teste da Oxidase - Colocam-se 1 a 2 gotas do reagente da oxidase num papel de filtro e com uma ansa de 1 ml retira-se uma colónia e esfrega-se no papel de filtro.

Teste OF (fermentação da glucose) - Cada colónia oxidase negativa foi inoculada por método de picada para 2 tubos contendo meio de cultura semi-gelosado OF. Adiciona-se a um dos tubos 2 ml de parafina comercial esterilizada. Incubam-se os tubos a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$.

A contagem foi feita de acordo com as seguintes indicações:

Teste da oxidase - A reacção diz-se oxidase positiva quando surge uma cor azul/roxo em 10 s.

Teste OF (fermentação da glucose) – registar os resultados para formação de gás, acidificação do meio e mobilidade.

Contaram-se como *Enterobacteriaceae* as colónias que apresentaram resultado para reacção de oxidase negativa e fermentaram a glucose nos tubos de OF com e sem parafina (meio de cultura passa a amarelo quando ocorre a acidificação consequente da fermentação da glucose). O tratamento dos resultados foi feito de acordo com o protocolo presente no ANEXO I.

Contagem de Bactérias ácido lácticas

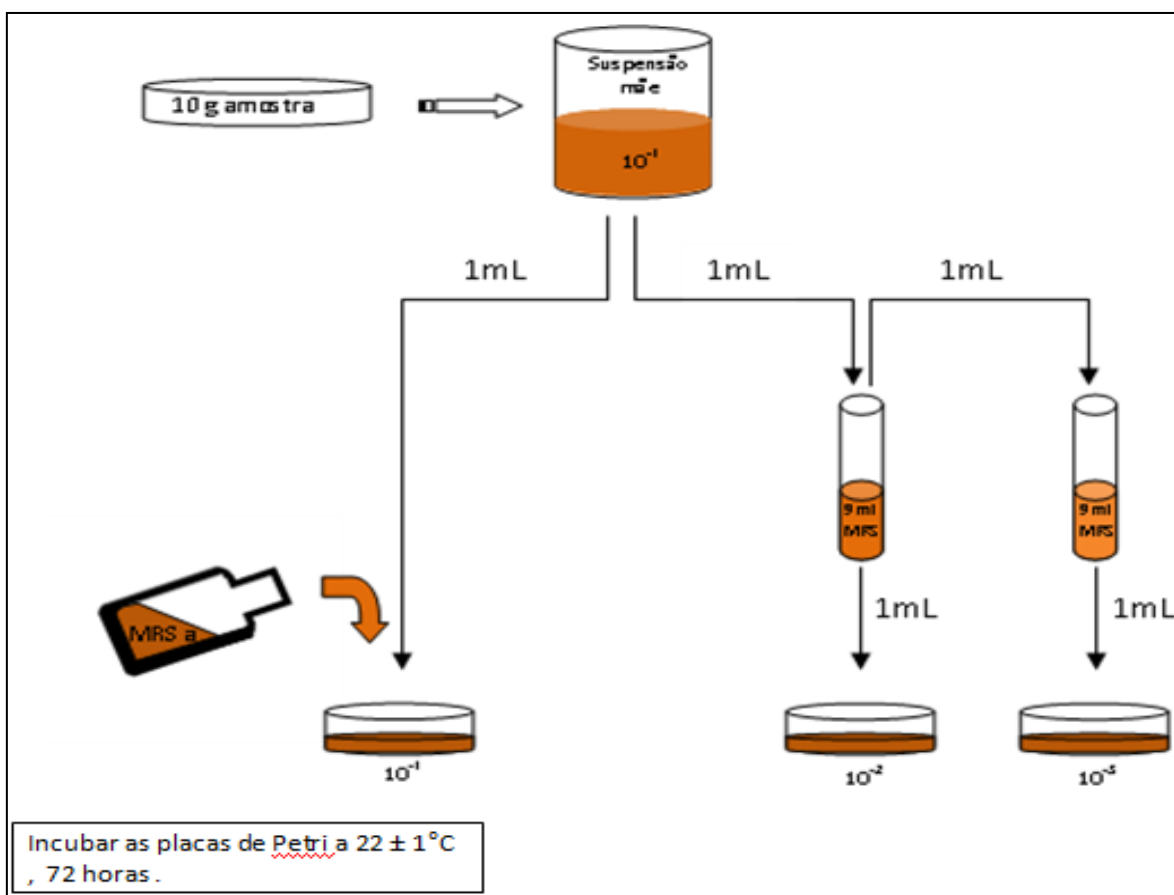


Fig 3: Esquema do método utilizado para a contagem de bactérias ácido lácticas.

Efectuou-se segundo uma adaptação das ISO 6887-1(1999) , ISO 6887-3 (2003) .

Tal como o representado no esquema da fig. 3, pesaram-se 10 g da amostra para saco de homogeneizador Stomacher, juntou-se 90 ml de solução MRS broth e homogeneizou-se em Stomacher durante 60 s à velocidade normal. Obteve-se deste modo a suspensão-mãe (10^{-1}).

Semearam-se-se 2 ml da suspensão-mãe em duas placas de Petri (1 ml em cada, sendo que a segunda é considerada o duplicado), e 1 ml da mesma para um tubo de ensaio com 9 ml de diluente MRD obtendo-se assim a diluição 10^{-2} .

Repetir o procedimento as vezes necessárias para obter as diluições pretendidas.

Adicionou-se o meio de cultura MRS agar fundido e arrefecido a cerca de 45 °C a cada duas placas de Petri .Deixar solidificar e incubar as placas invertidas a 22 °C \pm 1 °C durante 72 h \pm 2 h.

Resultados e Discussão

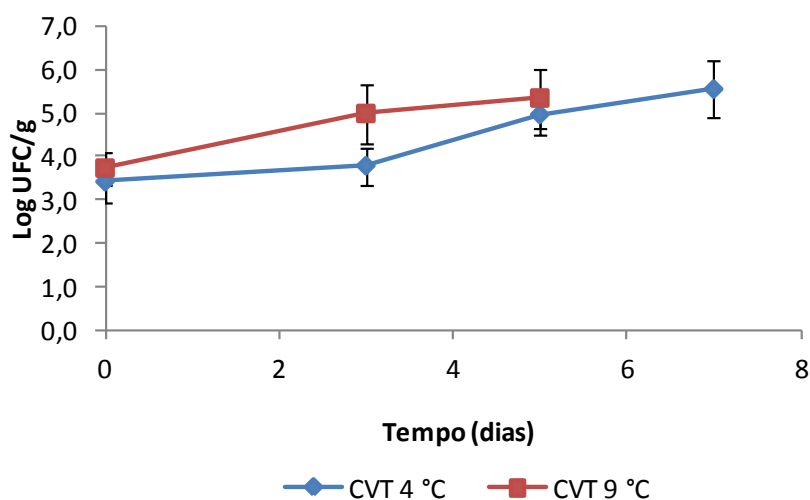
No dia sete de armazenagem, apenas foi possível realizar amostragem para uma das temperaturas de armazenagem, a 4 °C, dado que a 9°C a mortalidade da amêijoas foi > 50%.

9. Resultados microbiológicos

De um modo geral verificou-se que a flora microbiológica dominante na amêijoas conservada a 4-9°C era constituída por microrganismos com temperaturas óptimas inferiores a 30°C. Destes, cerca de 1/10 possuíam a capacidade de produzir sulfureto de hidrogénio, podendo provocar alterações de qualidade no produto.

9.1 Contagem de microrganismos viáveis totais (CTV (30°C))

Gráfico 1. Conservação em refrigerado de 4 - 9 °C. Teores de microrganismos viáveis totais 30°C



Ao longo do mesmo período de amostragem os valores obtidos nas amêijoas armazenadas a 4°C foram sempre inferiores aos registados nas amêijoas armazenadas a 9°C.

No dia zero de armazenagem, os valores obtidos para as duas condições de armazenamento (4 e 9°C) estiveram compreendidos entre 3,4 e 3,7, Log₁₀ UFC/g, podendo dever-se este facto à variabilidade da matéria-prima utilizada.

No dia três de armazenagem, os valores obtidos aumentaram apenas 0,4 Log₁₀ UFC/g (de 3,4 para 3,8), para o caso da temperatura de armazenamento de 4°C, e 1,3 Log₁₀ UFC/g, (de 3,7 para 5,0 Log₁₀ UFC/g), para o caso da temperatura de 9°C.

No dia cinco de armazenagem, os valores obtidos aumentaram 1,2 Log₁₀ UFC/g, (de 3,8 para 5,0 Log₁₀ UFC/g), para o caso da temperatura de 4°C, e apenas 0,2 Log₁₀ UFC/g (de 5,0 para 5,2), para o caso da temperatura de armazenamento de 9°C.

No dia sete de armazenagem, os valores obtidos aumentaram 0,6 Log₁₀ UFC/g, (de 5,0 para 5,6 Log₁₀ UFC/g), para o caso da armazenagem à temperatura de 4 °C.

É de referir que uma variação de cerca de 0,5 Log em contagens em meio sólido pode dever-se à incerteza da medição, não devendo ser consideradas como significativas diferenças inferiores a este valor.

Observou-se que todos os valores obtidos ao longo do ensaio estavam abaixo do logaritmo do valor de referência definido para este parâmetro por entidades de referência, que é 5,7 [i.e. Log₁₀ (5x10⁵)] UFC/g (ICMSF, 1986). Neste contexto, se a avaliação microbiológica dependesse apenas do teor em contagens viáveis totais a 30 °C detectados no produto, a amêijoia podia considerar-se apta para consumo humano nas duas condições de armazenagem.

Tabela 2

Valores médios das contagens de microrganismos viáveis totais a 30°C (Log UFC/g).

Legenda: Letras diferentes - significam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) nos valores das colunas. Números diferentes - significam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) nos valores das linhas. ND – Não determinado.

Dias	Temperatura de armazenamento	
	4 °C	9 °C
0	3,4 ^{a, 1}	3,7 ^{a, 1}
3	3,8 ^{a, 1}	5,0 ^{b, 2}
5	5,0 ^{b, 1}	5,2 ^{b, 1}
7	5,6 ^b	ND

Analisando os dados estatísticos verificou-se que, para a temperatura de armazenamento de 4 °C, não existiam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre o valor do dia inicial (dia zero) e o terceiro dia de armazenamento, nem entre o quinto e sétimo dias de armazenamento. Contudo denotavam-se diferenças estatisticamente significativas entre o primeiro conjunto de resultados e o segundo. Assim, os resultados demonstram que, entre os dias 3 e 5 de armazenamento a 4 °C, ocorreu um aumento significativo de microrganismos viáveis totais a 30 °C na amêijoia.

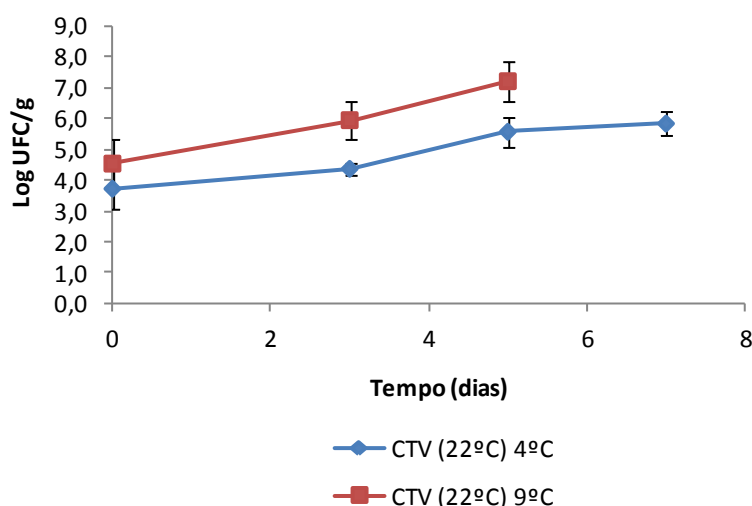
Para a temperatura de armazenamento de 9 °C, constatou-se que não existiam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$), entre o terceiro e o quinto dias de armazenamento. No entanto, registaram-se diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre o dia inicial amostragem e os restantes dias. Deste modo, os resultados demonstram que, entre os dias 0 e 3 de armazenamento a 9 °C, ocorreu um aumento significativo de microrganismos viáveis totais a 30 °C na amêijoia.

Apenas foram evidenciadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre as duas temperaturas nos valores observados para o terceiro dia de armazenamento. Estes resultados demonstram que, para períodos de armazenamento de amêijoia superiores a 2 dias, será aconselhável adoptar temperaturas de 4 °C em

vez de 9° C, de modo a evitar um aumento nos teores de microrganismos viáveis totais a 30 °C na amêijoa.

9.2 Contagem de microrganismos viáveis totais (CTV (22°C))

Gráfico 2. Conservação em refrigerado de 4 - 9 °C. Teores de microrganismos viáveis totais 22°C .



Ao longo do mesmo período de amostragem os valores obtidos nas amêijoas armazenadas a 4°C foram sempre inferiores aos registados nas amêijoas armazenadas a 9°C.

No dia zero de armazenagem, os valores obtidos para as duas condições de armazenamento (4 e 9°C) estiveram compreendidos entre 3,7 e 4,5, Log₁₀ UFC/g, podendo dever-se este facto à variabilidade da matéria-prima utilizada.

No dia três de armazenagem, os valores obtidos aumentaram 0,7 Log₁₀ UFC/g (de 3,7 para 4,4), para o caso da temperatura de armazenamento de 4°C, e 1,4 Log₁₀ UFC/g, (de 4,5 para 5,9 Log₁₀ UFC/g), para o caso da temperatura de 9°C.

No dia cinco de armazenagem, os valores obtidos aumentaram 1,2 Log₁₀ UFC/g, (de 4,4 para 5,6 Log₁₀ UFC/g), para o caso da temperatura de 4°C, e 1,3 Log₁₀ UFC/g (de 5,9 para 7,2), para o caso da temperatura de armazenamento de 9°C.

No dia sete de armazenagem, os valores obtidos aumentaram apenas 0,2 Log₁₀ UFC/g, (de 5,6 para 5,8 Log₁₀ UFC/g), para o caso da armazenagem à temperatura de 4 °C.

É de referir que uma variação de cerca de 0,5 Log em contagens em meio sólido pode dever-se à incerteza da medição, não devendo ser consideradas como significativas diferenças inferiores a este valor.

Observou-se que alguns valores obtidos ao longo do ensaio eram superiores ao logaritmo do valor de referência definido para este parâmetro por entidades de referência, que é 5,7 [i.e. $\text{Log}_{10} (5 \times 10^5)$] UFC/g (ICMSF, 1986). Neste contexto, se a avaliação microbiológica dependesse apenas do teor em contagens viáveis totais a 22 °C detectados no produto, a amêijoia podia considerar-se apta para consumo humano, até ao quinto dia, se estivesse armazenada a 4 °C. Quando armazenada a 9 °C já não se podia considerar apta para consumo humano a partir do terceiro dia.

Tabela 3.

Valores médios das contagens de microrganismos viáveis totais a 22°C (Log UFC/g)

Legenda: Letras diferentes - significam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) nos valores das colunas. Números diferentes - significam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) nos valores das linhas. ND – Não determinado.

Dias	Temperatura de armazenamento	
	4 °C	9 °C
0	3,7 ^{a, 1}	4,5 ^{a, 1}
3	4,4 ^{a, 1}	5,9 ^{b, 2}
5	5,6 ^{b, 1}	7,2 ^{b, 2}
7	5,8 ^b	ND

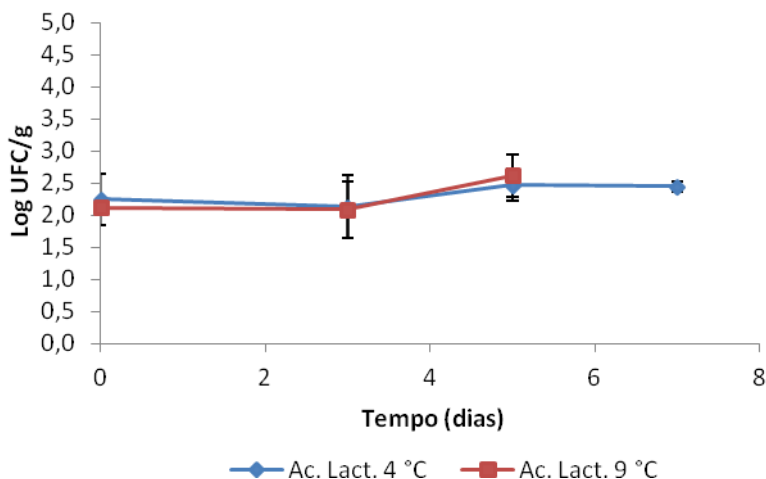
Analisando os dados estatísticos verificou-se que, para as temperaturas de armazenamento de 4 °C e 9°C se observaram diferenças estatísticas semelhantes às observadas na amêijoia para o parâmetro teores de microrganismos viáveis totais a 30 °C.

Apenas foram evidenciadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre as duas temperaturas nos valores observados para o terceiro e quinto dias de armazenamento. Estes resultados demonstram que, para períodos de armazenamento de amêijoia superiores a 2 dias, será aconselhável adoptar temperaturas de 4 °C em

vez de 9° C, de modo a evitar um aumento nos teores de microrganismos viáveis totais a 22 °C na amêijoa.

9.3 Pesquisa de bactérias Ácido-láticas

Gráfico 3. Conservação em refrigerado de 4 - 9 °C. Teores de bactérias ácido-láticas



Ao longo do todo período de amostragem os valores obtidos nas amêijoas armazenadas a 4 e 9°C revelaram-se muito semelhantes e com baixa variação.

No dia zero de armazenagem, os valores obtidos para as duas condições de armazenamento (4 e 9°C) estiveram compreendidos entre 2,3 e 2,1, Log₁₀ UFC/g. No final do ensaio os valores obtidos para o caso da temperatura de armazenagem de 4°C, eram semelhantes aos iniciais, enquanto que para o caso da temperatura de 9°C os valores obtidos aumentaram 0,5 Log₁₀ UFC/g.

Dado o desenvolvimento diminuto de bactérias-produtoras de ácido láctico durante a armazenagem da amêijoa, a degradação da qualidade deste produto não pode ser atribuída a uma fermentação láctica, tal como descrito por alguns autores.

Tabela 4

Valores médios da pesquisa de bactérias ácido-láticas (Log UFC/g) Legenda: Letras diferentes - significam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) nos valores das colunas. Números diferentes - significam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) nos valores das linhas. ND – Não determinado.

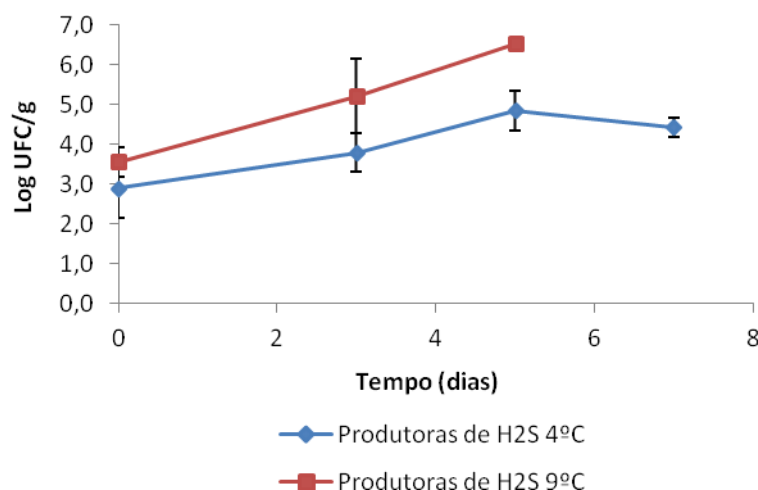
Dias	Temperatura de armazenamento	
	4 °C	9 °C
0	2,3 ^{a, 1}	2,1 ^{a, 1}
3	2,1 ^{a, 1}	2,1 ^{a, 1}
5	2,5 ^{a, 1}	2,6 ^{a, 1}
7	2,4 ^a	ND

Analisando os dados estatísticos verificou-se que, para a nenhuma das temperaturas (4 °C e 9°C), existiam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os valores correspondentes a cada dia de armazenamento.

Estes resultados demonstram que no que diz respeito às bactérias ácido-láticas ambas as temperaturas foram consideradas aceitáveis para a conservação da amêijoia. Quer isto dizer que nenhuma destas temperaturas favoreceu o crescimento de bactérias ácido-láticas.

9.4 Contagem de bactérias produtoras de sulfureto de hidrogênio (H₂S)

Gráfico 4. Conservação em refrigerado de 4 - 9 °C. Teores de bactérias produtoras de Sulfureto de Hidrogênio (H₂S)



Ao longo do mesmo período de amostragem os valores obtidos nas amêijoas armazenadas a 4°C foram sempre inferiores aos registados nas amêijoas armazenadas a 9°C.

No dia zero de armazenagem, os valores obtidos para as duas condições de armazenamento (4 e 9°C) estiveram compreendidos entre 2,9 e 3,6, Log₁₀ UFC/g, podendo dever-se este facto à variabilidade da matéria-prima utilizada.

No dia três de armazenagem, os valores obtidos aumentaram 0,9 Log₁₀ UFC/g (de 2,9 para 3,8), para o caso da temperatura de armazenamento de 4°C, e 1,6 Log₁₀ UFC/g, (de 3,6 para 5,2 Log₁₀ UFC/g), para o caso da temperatura de 9°C.

No dia cinco de armazenagem, os valores obtidos aumentaram 1,0 Log₁₀ UFC/g, (de 3,8 para 4,8 Log₁₀ UFC/g), para o caso da temperatura de 4°C, e 1,3 Log₁₀ UFC/g (de 5,2 para 6,5), para o caso da temperatura de armazenamento de 9°C.

No dia sete de armazenagem, os valores obtidos diminuíram 0,4 Log₁₀ UFC/g (de 4,8 para 4,0 Log₁₀ UFC/g), para o caso da armazenagem à temperatura de 4 °C.

Esta observação foi inesperada e contrária às tendências anteriores. No entanto, é de relembrar que uma variação de cerca de 0,5 Log em contagens em meio sólido pode dever-se à incerteza da medição, não devendo ser consideradas como significativas diferenças inferiores a este valor.

Observou-se que apenas a partir do terceiro dia de armazenamento a 9 °C os valores foram superiores ao logaritmo do valor de referência definido para este parâmetro por entidades de referência, que é 5,7 [i.e. $\text{Log}_{10} (5 \times 10^5)$] UFC/g (ICMSF, 1986). Neste contexto, se a avaliação microbiológica dependesse apenas do teor de bactérias produtoras de H_2S , a amêijoas estaria imprópria para consumo a partir do terceiro dia de armazenamento a 9°C.

Tabela 5

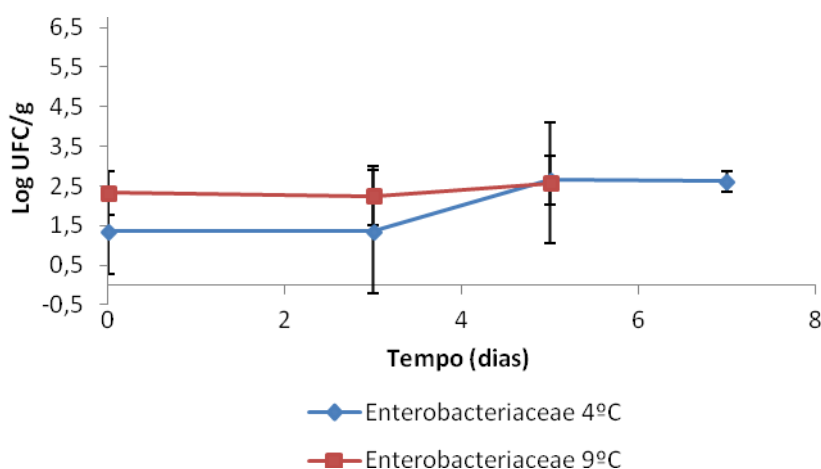
Valores médios contagem de bactérias produtoras de Sulfureto de hidrogénio (H_2S) (Log UFC/g) Legenda: Letras diferentes - significam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) nos valores das colunas. Números diferentes - significam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) nos valores das linhas. ND – Não determinado.

Dias	Temperatura de armazenamento	
	4 °C	9 °C
0	2,9 ^{a, 1}	3,6 ^{a, 1}
3	3,8 ^{a,b, 1}	5,2 ^{b, 2}
5	4,8 ^{b, 1}	6,5 ^{c, 2}
7	4,4 ^{a,b}	ND

Apenas foram evidenciadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre as duas temperaturas nos valores observados para o terceiro e quinto dias de armazenamento. Estes resultados demonstram que, para períodos de armazenamento de amêijoas superiores a 2 dias, será aconselhável adotar temperaturas de 4 °C em vez de 9° C, de modo a evitar um aumento nos teores de bactérias produtoras de H_2S na amêijoas, à semelhança do observado anteriormente para as contagens de microrganismos viáveis.

9.5 Contagem de Enterobacteriaceae

Gráfico 5. Conservação em refrigerado de 4 - 9 °C. Teores de *Enterobacteriaceae*.



Ao longo do mesmo período de amostragem os valores obtidos nas amêijoas armazenadas a 4°C foram sempre inferiores ou iguais aos registados nas amêijoas armazenadas a 9°C. A esta temperatura (de 9°C) os valores obtidos apresentaram-se quase constantes.

No dia zero de armazenagem, os valores obtidos para as duas condições de armazenamento (4 e 9°C) estiveram compreendidos entre 1,4 e 2,3, Log₁₀ UFC/g. No final do ensaio os valores obtidos para as duas condições eram semelhantes, uma vez que, para o caso da temperatura de armazenamento de 4°C aumentaram 1,2 Log₁₀ UFC/g, enquanto que os valores obtidos para o caso da temperatura de 9°C aumentaram apenas 0,2 Log₁₀ UFC/g, sendo semelhantes aos iniciais.

Dado o desenvolvimento diminuto de bactérias pertencentes a esta família durante a armazenagem da amêijoa, a degradação da qualidade deste produto não pode ser atribuída a uma fermentação por Enterobacteriaceae.

Tabela 6

Valores médios de contagem de bactérias *Enterobacteriaceae* (Log UFC/g). Legenda: Letras diferentes - significam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) nos valores das colunas. Números diferentes - significam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) nos valores das linhas. ND – Não determinado.

Dias	Temperatura de armazenamento	
	4 °C	9 °C
0	1,4 ^{a, 1}	2,3 ^{a, 1}
3	1,4 ^{a, 1}	2,3 ^{a, 1}
5	2,6 ^{a, 1}	2,6 ^{a, 1}
7	2,6 ^a	ND

Analisando os dados estatísticos verificou-se que não existiam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os valores correspondentes a cada dia de armazenamento para ambas as temperaturas (4 °C e 9 °C).

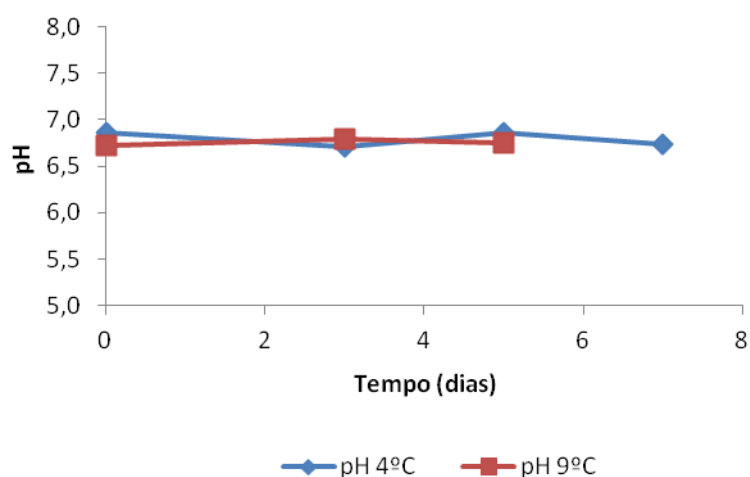
Não obstante, para armazenamentos a uma temperatura de 4 °C, será aconselhável adoptar períodos de conservação inferiores a 5 dias.

Estes resultados demonstram que no que diz respeito às *Enterobacteriaceae* ambas as temperaturas foram consideradas aceitáveis para a conservação da amêijoia. Quer isto dizer que nenhuma destas temperaturas favorece o crescimento de *Enterobacteriaceae*.

10. Resultados físico-químicos

10.1 pH

Gráfico 6. Conservação em refrigerado de 4 - 9 °C. Teores de pH.



Ao longo do todo período de amostragem os valores obtidos nas amêijoas armazenadas a 4 e 9 °C revelaram-se muito semelhantes e com baixa variação.

No dia zero de armazenagem, os valores obtidos para as duas condições de armazenamento (4 e 9 °C) estiveram compreendidos entre 6,9 e 6,7

Do dia 3 para o dia 5 o valor correspondente à temperatura de 9°C mantém-se, enquanto que para os 4°C à uma pequena subida de 0,2 ; sendo que os valores das duas temperaturas ao fim dos 5 dias de armazenagem varia apenas 0,1 (com 6,9 para os 4°C e 6,8 para os 9°C). Para a temperatura de 4°C verificou-se que seria possível fazer mais um dia de amostragem notando-se assim uma ligeira descida do dia 5 para o dia 7 de 6,9 para 6,7.

Tabela 7

Valores médios de pH. Legenda: Letras diferentes - significam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) nos valores das colunas. Números diferentes - significam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) nos valores das linhas. ND – Não determinado.

Dias	Temperatura de armazenamento	
	4 °C	9 °C
0	6,9 ^{a, 1}	6,7 ^{a, 1}
3	6,7 ^{a, 1}	6,8 ^{a, 1}
5	6,9 ^{a, 1}	6,8 ^{a, 1}
7	6,7 ^a	ND

Analisando os dados estatísticos verificou-se que, para nenhuma das temperaturas (4 °C e 9°C), existiam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os valores correspondentes a cada dia de armazenamento.

Estes resultados demonstram que no que diz respeito ao pH ambas as temperaturas foram consideradas aceitáveis para a conservação da amêijoas, visto que as variações dos valores desde o início do ensaio até ao final não se verificaram serem significativas.

Conclusões

No presente trabalho foram utilizadas quatro amostras, sendo que foram armazenadas, *em vivo*, duas a 4 °C e outras duas a 9 °C e determinou-se que para cada dia de ensaio só se prosseguiria se a mortalidade fosse inferior a 50%. Sendo que apenas uma das amostragens chegou ao dia 7 de armazenamento (tendo sido este armazenamento feito a 4 °C).

Assim, chegando ao final deste trabalho, e tendo em conta os resultados analisados, torna-se pertinente tecer algumas conclusões.

Em primeiro lugar, com base no presente estudo pode concluir-se que no que diz respeito ao teor em contagens viáveis totais a 30 °C detectados no produto, a amêijoia podia considerar-se apta para consumo humano nas duas condições de armazenagem. Contudo é de notar que, para períodos de armazenamento superiores a 2 dias, será aconselhável adoptar temperaturas de 4 °C em vez de 9° C, de modo a evitar um aumento nos teores de microrganismos viáveis totais a 30 °C na amêijoia.

Por sua vez em relação ao teor em contagens viáveis totais a 22 °C detectados no produto, a amêijoia podia considerar-se apta para consumo humano, até ao quinto dia, se estivesse armazenada a 4 °C. Quando armazenada a 9 °C já não se podia considerar apta para consumo humano a partir do terceiro dia. Concluindo-se mais uma vez que, a temperatura de armazenamento aconselhável a partir de dois dias seria de 4 °C.

Os dados obtidos nesta investigação permitiram também identificar que nenhuma das temperaturas de armazenamento favorece o crescimento de bactérias ácido-lácticas. Pelo que a degradação natural do produto não pode ser atribuída à fermentação láctica realizada por estas bactérias.

O presente estudo destaca igualmente que dado o desenvolvimento diminuto de bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae* durante a armazenagem da amêijoia, a degradação da qualidade deste produto não pode ser atribuída a uma fermentação realizada por estas bactérias.

Analisando os resultados obtidos pela contagem de bactérias produtoras de sulfureto de hidrogénio pode-se concluir que assim como os dados das contagens totais mostram a partir de dois dias de armazenamento a melhor temperatura a adoptar é a de 4 °C.

No que respeita à avaliação do pH, os seus valores mantiveram-se constantes ao longo de todo o ensaio o que leva a concluir que a este nível qualquer uma das temperaturas de armazenamento é eficaz na preservação da qualidade do produto.

Pelo que se referiu, os resultados obtidos ressaltam a conveniência da utilização de uma temperatura de 4 °C em caso de necessidade de armazenar a amêijoas por um período superior a 2 dias.

Em quase todos os ensaios (exceptuando um) a partir do quinto dia de armazenamento verificou-se uma mortalidade superior a 50 % pelo que pode-se dizer que mesmo a 4 °C não é conveniente que o período de armazenamento seja superior a 5 dias.

Perspectivas Futuras

Em futuras investigações seria interessante fazer uma avaliação de matéria-prima que tenha sido capturada de um modo diferente, isto é, sendo utilizado um método de captura menos invasivo causando assim menos “ stress “ no momento de captura. Com este método seria provável, então um menor índice de mortalidade, sendo por isso possível ter mais pontos de amostragem e por isso mais conclusões a nível da qualidade microbiológica e química de bivalves vivos perante as duas temperaturas de armazenamento em estudo.

Ao nível do armazenamento poderia também vir a ser feita uma nova adaptação, utilizando uma atmosfera enriquecida em oxigénio com o objectivo de diminuir o metabolismo dos bivalves vivos durante armazenamento, sendo assim aumentada a viabilidade da amostra.

Bibliografia

- Aaraas, R., Hernar, I. J., Vorre, A., Bergslien, H., Lunestad, B. T., Skeie, S., Slinde, E. & Mortensen, S. (2004). Sensory, Histological, and Bacteriological Changes in Flat Oysters, *Ostrea edulis* L., during Different Storage Conditions. *Journal of Food Science*, 69, 205-210.
- Almeida, A.; Ruiz, J. A.; López, N. I. & Pettinari e M. J. (2004). Bioplásticos – Uma alternativa ecológica. *Revista Química Viva*, Vol.3, No.3, September 2004, 122 -133.
- Baixas-Nogueras, S.; Bover-Cid, S.; Veciananoques, T. et al. (2002). Chemical and sensory changes in mediterranean hake (*Merluccius merluccius*) under refrigeration (6-8 °C) and stored in ice. *J. Agric. Food Chem.*, v.50, p.6504-6510.
- Bandarra, N. M. ; Calhau, M.A.; Oliveira, L.; Ramos, M. ; Dias, M.G.; Bártolo, H ;Faria, M.R. ; Fonseca, M.C.; Gonçalves, J. ; Batista, I. ; Nunes, M. L. (2004). Composição e valor nutricional dos produtos da pesca mais consumidos em Portugal. *Publicações Avulsas do IPIMAR*, 11, 103 p.
- Baya, A.M., Toranzo, A.E., Lupiani, B., Li, T., Roberson, B.S., Hetrick, F.M., (1991). Biochemical and serological characterization of *Carnobacterium* spp. Isolated from farmed and natural populations of striped bass and catfish. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 3114 - 3120.
- Boyd, N. S., Wilson, N. D. C. & Hall, B. I. (1980). Storage of live Pacific oysters out of water. *New Zealand Journal of Science*, 23, 171-176.
- Burton, M.C. (1949). Comparison of coliform and enterococcus organisms as indices of pollution in frozen foods. *Food Res.* 14:434–448.
- Cao, R., Xue, C.-H., Liu, Q. & Xue, Y. (2009). Microbiological, chemical, and sensory assessment of Pacific Oysters (*Crassostrea gigas*) stored at different temperatures. *Czech Journal of Food Sciences*, 27, 102-108.
- Cardinal, M., Gunnlaugsdottir, H., Bjoernevik, M., Ouisse, A., Vallet, J.L. & Leroi, F., (2004). Sensory characteristics of cold-smoked atlantic salmon (*Salmo salar*) from European market and relationships with chemical, physical and microbiological measurements. *Food Res. Int.* 37, 181e193.
- Carvalheiro, J. (2007). Pesca de arrasto com ganchorras. [Consultado em Outubro de 2011] Disponível em <http://apescadesportiva.blogspot.com/2007/11/pesca-de-arrasto-com-ganchorra.html>
- Castilho, F. (2010) “Controlo de Qualidade de Moluscos Bivalves Vivos”, Monografia, Matosinhos, 32p.
- Codex Alimentarius Commission (2003) “Recommended International Code of Practice – General Principles of Food Hygiene”, CAC/RCP 1, última actualização em 2003. [consultado em Outubro de 2011], Disponível em www.codexalimentarius.net/web/more_info.jsp?id_sta=23
- Conde, J.M.M. (1975). *Guia del inspector veterinário titular: 1-bromotologia sanitaria*. Barcelona: Biblioteca Veterinária Aedos,. p.190-260.
- DGPA (2006). Recursos da pesca. Série Estatística 2005. Direcção Geral das Pescas e Aquicultura, Lisboa, 19 A-B, 185 p.

- FAO. © 1995. Assessment of food quality. Text by Huss, H.H. In: *Quality and quality changes in fresh fish* [online]. Rome. [Cited October 2011]. [www.fao.org/docrep_v7180e_v7180e09.htm](http://www.fao.org/docrep/v7180e/v7180e09.htm)
- FAO. © 2006-2011. Cultured Aquatic Species Information Programme. *Venerupis pullastra*. Cultured Aquatic Species Information Programme. Text by Figueras, A. In: FAO Fisheries and Aquaculture Department [online]. Rome. Updated 26 February 2006. [Cited 27 October 2011]. Disponível em : http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Venerupis_pullastra/en
- Ferreira, E. P. (1988). Galicia en el comercio marítimo medieval. Fundacion 'Pedro Barrie de la Maza'. Colección de Documentos Históricos. 903 pp.
- Figueras, A. (1957). Moluscos de las playas de la ría de Vigo. II. crecimiento y reproducción. *Investigación Pesquera*, 7:49-97.
- Fontes, M.C., Esteves, A., Caldeira, F., Saraiva, C., Vieira-Pinto, M. e Martins, C. (2007). Estado de frescor e qualidade higiénica do pescado vendido numa cidade do interior de Portugal. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.59, n.5, p.1308-1315.
- François, L. (2010). Occurrence and role of lactic acid bacteria in seafood products, *Food Microbiology*, 27, 698-709
- Gonçalves, A., Pedro, S., Duarte, A. & Nunes, M.L. (2009). Effect of enriched oxygen atmosphere storage on the quality of live clams (*Ruditapes decussatus*). *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 2598-2605.
- Gonçalves, A. (2010). *Qualidade e valorização em Aquacultura, Propriedades sensoriais e período de conservação útil de peixe e bivalves*. Tese de Doutoramento em Farmácia (bromatologia), Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, Portugal.
- Goulas, A. E., Choulirara, I., Nessi, E., Kontominas, M. G. & Savva, I. N. (2005). Microbiological, biochemical and sensory assessment of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) stored under modified atmosphere packaging. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 752-760.
- Gram, L., Trolle, G. & Huss, H.H. (1987). Detection of specific spoilage bacteria from fish stored at low and high temperatures. *Int. J. Food Microbiol.* 4, 65-72.
- Gram, L. & Huss, H. H. (1996). Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology*, 33, 121-137.
- Hackery, C. R., Pierson, M. O. (1995) : Environmental Indicators and Shellfish Safety. Pag. 30-391
- Hansen, L. T., Gill, T., Drewes Røntved, S. & Huss, H.H., (1996). Importance of autolysis and microbiological activity on quality of cold-smoked salmon. *Food Res. Int.* 29, 181-188.
- Hayes, P. R. (1995). *Food microbiology and hygiene*. London: Chapman & Hal.

- ICMSF , (1986) Microorganisms in Foods, 2. Sampling for Microbiological Analysis. Principles and Specific Applications, 2nd Edition, Blackwell Scientific Publications, 278p.
- IPIMAR,2008. Produção,salubridade e comercialização dos moluscos bivalves em Portugal.Ed. SILVA,H.A. , BATISTA, I. Publicações Avulsas do IPIMAR,20, 171 p.
- ISO 15214 : 1998 - Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria – Colony -count technique at 30° C.
- ISO 21528-2 (2004) - Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal methods for the detection and enumeration of *Enterobacteriaceae* – Part 2: Colony-count method.
- ISO 6887-1(1999) – Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilution.
- ISO 6887-3 (2003) – Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 3: Specific rules for the preparation of fish and fishery products.
- ISO 7218, (2007). Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examinations, 66p.
- Khan, M. A., Parrish, C. C. & Shahidi, F. (2005). Quality indicators of cultured Newfoundland blue mussels (*Mytilus edulis*) during storage on ice: microbial growth, pH, lipid oxidation, chemical composition characteristics, and microbial fatty acid contents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 7067-7073.
- Levin, R.E. (1968). Detection and incidence of specific species of spoilage bacteria on fish. *Methodology Appl. Microbiol.* ,1(16) , 1734-1737.
- Leroi, F., Joffraud, J.J., Chevalier, F., Cardinal, M.,(2001) Research of quality indices for cold-smoked salmon using a stepwise multiple regression of microbiological counts and physico-chemical parameters. *J. Appl. Microbiol.*, 578 – 587.
- Matias, D. (2007) “A cultura da Ameijoia-boa (*Ruditapes decussates*, L.) em Viveiros da Ria Formosa: Avaliação do Crescimento e Qualidade Face a Diferentes Condições de Cultura e Situações Ambientais”.Trabalho de Síntese apresentado para provas de acesso á categoria de Assistente de Investigação.96 p.
- Medeiros, A.A, (1997). Relapsing infection due to *Enterobacter* species: lessons of heterogeneity. *Clin Infect Dis* ,25, 341/2.
- NP 3278, 1986.Pescado e derivados. Contagem de microrganismos a 30°C. Lisboa, Direcção geral da Qualidade, 6p.
- Nunes,M.L, e Campos,C.C. (2008). *Qualidade e Segurança dos Moluscos Bivalves*, INIAP/IPIMAR, Texto de Comunicação,Lisboa,5 p.

- Ostrolenk, M., N. Kramer, and R.C. Cleverdon. (1947). Comparative studies of enterococci and *Escherichia coli* as indices of pollution. *J. Bacteriol.* 53:197–203.
- Ruiz-Capillas, C. & Moral, A. (2005). Sensory and biochemical aspects of quality of whole bigeye tuna (*Thunnus obesus*) during bulk storage in controlled atmospheres. *Food Chemistry*, 89, 347-354.
- Sanders, W.E, Sanders, C.C. (1997). Enterobacter spp. pathogens poised to flourish at the turn of the century. *Clin Microbiol Rev*, 10, 220/41.
- Scharlau Handbook of Microbiological Culture Media Edition (2000) No. 10 p. 106.
- Silva,F. (2011). *Avaliação da contaminação fecal da amêijoia-boia (Ruditapes decussatus) e respectiva zona de produção- Ria Formosa – Faro : Influência na Saúde Pública*. Tese de Mestrado em Segurança Alimentar e Saúde Pública, Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz,Portugal.
- Tailliez, P. (2001). Mini-revue: les bactéries lactiques, ces êtres vivants apparus il y a près de 3 milliards d'années. *Lait*, 1-11.
- Tejada, M. & Huidobro, A. (2002). Quality of farmed gilthead seabream (*Sparus aurata*) during ice storage related to the slaughter method and gutting. *European Food Research and Technology*, 215, 1-7.
- Gram, L., Trolle ,G. & Huss ,H.H. (1987). Detection of specific spoilage bacteria from fish stored at low and high temperatures. *Int. J. Food Microbiol.* 4, 65-72.
- Toranzo, A.E., Novoa, B., Baya, A.M., Hetrick, F.M., Barja, J.L., Figueras, A., 1993. Histopathology of rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss* (Walbaum), and striped bass, *Morone saxatilis* (Walbaum), experimentally infected with *Carnobacterium piscicola*. *J. Fish Dis.* 16, 261 -267.
- UE ,(2006). Regulamento (CE). Nº 1881/2006 da Comissão.JO L364,20,12.2006,pp. 5-24.
- UE ,(2008). Regulamento (CE). Nº 629/2008 da Comissão.JO L173,30,07.2008,pp. 6-9.
- Wagenlehner,F.M.E. , F.M. MacKenzie, K.J. Forbes & I.M. Gould, (2002). : Molecular epidemiology and antibiotic resistance of *Enterobacter spp.* from three distinct populations in Grampian, UK ,*International Journal of Antimicrobial Agents* 20 ,419/425.
- Wittle, K.J.; Hardy, R.; Holden, A.V. ;Johnston, R. ; Pentreath, R.J. (1977). *Occurrence and fate of organic and inorganic contaminants on marine animals. In: Aquatic Pollutants and Biologic Effectes with emphasis on neoplasia*. Published by The New York Academy of Sciences, 604p.

Anexo I

- Metodologias -

Contagem de bactérias produtoras de Sulfureto de hidrogénio a 25°C (ISO 7218, 2007; ISO 6887-1(1999); ISO 6887-3 (2003); Scharlau, 2000)

1. Objectivo e Campo de Aplicação

Este procedimento descreve o método analítico utilizado para a “Contagem de Bactérias produtoras de H₂S “. O método aplica-se a produtos da pesca e derivados.

2. Definição e Resumo do Processo

Como exemplos de bactérias produtoras de H₂S existem as *Shewanella putrefaciens* e *Aeromonas hydrophila*.

O método baseia-se na sementeira por incorporação de diferentes volumes de amostra em meio de cultura. Segue-se a Incubação das placas a 25 ± 1°C durante 72 a 120 horas (3- 5 dias). Por fim, calcula-se o número de unidades formadores de colónias produtoras de H₂S por grama de amostra.

3. Modo Operativo

3.1 Meios de cultura e Reagentes

Solução de Maximum Recovery Diluent (MRD) – marca Oxoid, Ref^a CM0361

Meio de Lingby Iron Agar Base (IA) - marca Scharlau, Ref^a 01-584

L- Cysteina - marca Sigma, Ref^a C- 8152

Estes meios encontram-se comercializados sob a forma desidratada e são preparados de acordo com as instruções do fabricante

.

3.2 Aparelhos e Utensílios

Material corrente em laboratório de microbiologia e nomeadamente:

Balança, sensível ao décimo de grama

Estufa de incubação, regulável a $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$

Stomacher

Homogeneizador tipo vortex

3.3 Técnica

3.3.1 Preparação da suspensão mãe e diluições

Efectua-se segundo uma adaptação das ISO 6887-1(1999) , ISO 6887-3 (2003) e manual da Scharlau.

Pesa-se 10 g da amostra para saco de homogeneizador stomacher e junta-se 90 ml de solução MRD e homogeneíza-se em stomacher durante 45 s - 60 s à velocidade normal.

Obtém-se deste modo a suspensão mãe (10^{-1}). As diluições decimais seguintes são preparadas adicionando 1 ml da suspensão anterior a 9 ml de diluente (MRD). O número de diluições deve ser suficiente para obter até 150 colónias características.

3.3.2 Sementeira

Semeia-se 1 ml da suspensão-mãe para uma placa de Petri.

Transfere-se 1 ml da diluição seguinte para outra placa de Petri.

Procede-se igualmente para as restantes diluições.

Adicionar o meio de cultura adequado fundido e arrefecido a cerca de 45°C . Deixar solidificar.

Quando se suspeita de elevada contaminação da amostra é necessário semear várias diluições da amostra.

3.3.3 Incubação

Incubam-se as placas semeadas em estufa a $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 72 – 120 horas (3- 5 dias) .

3.3.4 Leitura

Contam-se as colónias presentes nas placas que contenham menos de 300 colónias.

As colónias típicas de bactérias produtoras de H₂S são colónias nitidamente pretas.

3.4 Resultados

Tratamento de resultados de acordo com a ISO ISO 7218, 2007 (E).

Para um resultado ser válido é necessário contar colónias em pelo menos uma placa contendo pelo menos 10 colónias. Calcular o número de microrganismos (N) presentes na amostra em duas diluições sucessivas de acordo com a seguinte equação (1):

$$N = \frac{\sum C}{V \times 1,1 \times d}$$

Onde:

$\sum C$ corresponde á soma das colónias contadas nas duas placas de diluições sucessivas onde, pelo menos numa, contém um mínimo de dez colónias;

V corresponde ao volume de inoculo em cada placa de Petri , expresso em ml;

d corresponde á diluição correspondente á primeira diluição contada.

O resultado é expresso com dois algarismos significativos.

Reportar o resultado como ufc/g.

Contagem de Microorganismos a 30°C em pescado e derivados (PTMA/MIC 007) [23,24,26,27] (ISO 6887-1, 1999; ISO 6887-3, 2003; NP 3278, 1986; ISO 7218, 2007)

1. Objectivo e Campo de Aplicação

Este procedimento descreve o método analítico utilizado para a “Contagem de Microrganismos Viáveis “. O método aplica-se a produtos da pesca e derivados.

2. Definição e Resumo do Processo

Entende-se por microrganismos apenas as bactérias, leveduras e outros fungos se desenvolvem nas condições a seguir descritas.

O método baseia-se na sementeira por incorporação de diferentes volumes de amostra em meio de cultura. Incubação das placas a 30 ± 1°C durante 72 horas. Cálculo do número de microrganismos viáveis por grama de amostra a partir do número de colónias obtidas.

3. Modo Operativo

3.1 Meios de cultura e Reagentes

Solução de Maximum Recovery Diluent (MRD) – marca Oxoid, Refª CM0361

Meio Plate Count Agar (PCA) - marca Merck, Refª 1.05463.0500.

Estes meios encontram-se comercializados sob a forma desidratada e são preparados de acordo com as instruções do fabricante.

3.2 Aparelhos e Utensílios

Material corrente em laboratório de microbiologia e nomeadamente:

Balança, sensível ao décimo de grama

Estufa de incubação, regulável a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$

Stomacher

Homogeneizador tipo vortex

3.3 Técnica

3.3.1 Preparação da suspensão mãe e diluições

Efectua-se segundo uma adaptação das ISO 6887-1(1999) e ISO 6887-3 (2003).

Pesa-se 10 g da amostra para saco de homogeneizador stomacher e junta-se 90 ml de solução MRD e homogeneiza-se em stomacher durante 45 s - 60 s à velocidade normal.

Obtém-se deste modo a suspensão mãe (10^{-1}). As diluições decimais seguintes são preparadas adicionando 1 ml da suspensão anterior a 9 ml de diluente (MRD). O número de diluições deve ser suficiente para obter até 150 colónias características.

3.3.2 Sementeira

Semeia-se um ml da suspensão-mãe para uma placa de Petri.

Transfere-se um ml da diluição seguinte para outra placa de Petri. Procede-se igualmente para as restantes diluições.

Adicionar o meio de cultura adequado fundido e arrefecido a cerca de 45°C . Deixar solidificar.

Quando se suspeita de elevada contaminação da amostra é necessário semear várias diluições da amostra.

3.3.3 Incubação

Incubam-se as placas semeadas em estufa a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 72 horas.

3.3.4 Leitura

Contam-se as colónias presentes nas placas que contenham menos de 300 colónias.

3.4 Resultados

Tratamento de resultados de acordo com a ISO ISO 7218, 2007 (E).

Para um resultado ser válido é necessário contar colónias em pelo menos uma placa contendo pelo menos 10 colónias. Calcular o número de microrganismos (N) presentes na amostra em duas diluições sucessivas de acordo com a seguinte equação (1):

$$N = \frac{\sum C}{V \times 1,1 \times d}$$

Onde:

$\sum C$ corresponde á soma das colónias contadas nas duas placas de diluições sucessivas onde, pelo menos numa, contém um mínimo de dez colónias;

V corresponde ao volume de inoculo em cada placa de Petri , expresso em ml;

d corresponde á diluição correspondente á primeira diluição contada.

O resultado é expresso com dois algarismos significativos.

Reportar o resultado como ufc/g.

Contagem de *Enterobactereaceae*

(ISO 6887-1, 1999; ISO 6887-3, 2003; ISO 7218, 2007)

1.Objectivo e campo de aplicação

O presente procedimento destina-se a estabelecer as regras gerais para a contagem de *Enterobacteriaceae* em todos os tipos de produtos alimentares.

2. Definição e resumo do processo

Para fins do presente procedimento, entende-se por:

Enterobacteriaceae: bactérias Gram negativas que fermentam a glucose. São microrganismos aeróbios facultativos, oxidase e catalase negativos, sendo que a maioria das espécies crescem a 37°C .

O método baseia-se na contagem de colónias características que crescem em meio gelosado VRBGA com sobre camada (criam-se condições de semi-anaerobiose que impedem o crescimento de bactérias Gram negativas não-fermentativas) e que apresentam reacção de oxidase negativa e fermentam a glucose presente no meio semi-gelosado (OF).

3. Modo operativo

3.1 Meios de cultura e reagentes

Solução de Maximum Recovery Diluent (MRD, Oxoid Ref^a CM0361)

Meio gelosado Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA, Oxoid Ref^a CM0485)

Meio de cultura nutritivo (Tryptona Soya Agar) (TSA, Merck Ref^a 1.05458.0500)

Meio semi-gelosado Oxidative Fermentative Medium (OF, Merck Ref^a 1.10282.0500)

Solução de glucose 10 %, Difco Ref^a 215530

Reagente da oxidase (BactiDropTM Oxidase, Remel, Ref^a.R21540)

Parafina, bioMérieux Ref 70100

Estes meios encontram-se comercializados sob a forma desidratada e são preparadas de acordo com as instruções do fabricante.

3.2 Aparelhos e utensílios

Material corrente em laboratório de microbiologia e nomeadamente:

Balança, sensível ao décimo de grama

Estufa de incubação, regulável a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$

Stomacher

Homogeneizador tipo vortex

3.3 Técnica

Efectua-se segundo adaptações das ISO 6887-1(1999), ISO 6887-3 (2003) e ISO 21528-2 (2004).

3.3.1 Preparação da suspensão mãe e diluições

Pesa-se 10 g da amostra para saco de homogeneizador stomacher e junta-se 90 ml de solução de triptona sal (ou MRD) e homogeneiza-se em stomacher durante 45 s - 60 s à velocidade normal. Obtém-se deste modo a suspensão mãe (10^{-1}).

As diluições decimais seguintes são preparadas adicionando 1 ml da suspensão anterior a 9 ml de diluente (triptona sal ou MRD). O número de diluições deve ser suficiente para obter até 150 colónias características.

3.3.2 Sementeira

Semeia-se 1 ml da suspensão-mãe e das seguintes diluições decimais em placas de Petri e inocula-se por incorporação o meio de cultura gelosado não selectivo TSA arrefecido a 45 °C (aproximadamente 10 ml). Deixa-se solidificar e adiciona-se uma segunda camada de VRBGA (aproximadamente 15 ml). Deixar solidificar.

Nota: Sempre que possível fazer inoculações em duplicado.

3.3.3 Incubação

As placas de petri são incubadas invertidas a 37 °C \pm 1 °C durante 24 h \pm 2 h.

3.3.4 Leitura

Contam-se como *Enterobacteriaceae* presuntivas as colónias características com 1 mm – 2 mm de diâmetro que apresentam cor violeta/rosa e halo da mesma cor.

Nota: Descartar as placas que apresentem um sobre crescimento à superfície em mais de metade da placa. Se o sobre crescimento for inferior a metade da placa, contar as colónias isoladas e extrapolar a contagem para o resto da placa.

3.3.5 Confirmação

Seleccionar 5 colónias características e repicá-las para meio nutritivo gelosado não selectivo (TSA) e incubar a 37 °C \pm 1 °C durante 24 h \pm 2 h.

Nota: Se não existirem colónias características presentes, escolher 5 colónias esbranquiçadas para confirmação (algumas *Enterobacteriaceae* causam a descoloração das colónias ou do meio).

Teste da Oxidase - Realizar o teste da oxidase na cultura obtida no meio TSA. Para este último, coloca-se 1 a 2 gotas do reagente da oxidase num papel de filtro e com uma ansa de 1 \square l retira-se uma colónia e esfrega-se no papel de filtro.

Teste OF (fermentação da glucose) - Cada colónia oxidase negativa deve ser inoculada por método de picada para 2 tubos contendo meio de cultura semi-gelosado OF. Adicionar a 1 dos tubos 2 ml de parafina comercial esterilizado. Incubar os tubos a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$.

3.3.5.1 Leitura da confirmação

Teste da oxidase - A reacção diz-se oxidase positiva quando surge uma cor azul/roxo em 10 s.

Teste OF (fermentação da glucose) – registar os resultados para formação de gás, acidificação do meio e mobilidade.

Contar como *Enterobacteriaceae* as colónias que apresentaram resultado para reacção de oxidase negativa e fermentaram a glucose nos tubos de OF com e sem parafina (meio de cultura passa a amarelo quando ocorre a acidificação consequente da fermentação da glucose).

3.4. Resultados

Calcular o número de *Enterobacteriaceae* (a) usando a seguinte fórmula:

$$a = \frac{b}{A} \times C$$

A

Onde:

b = nº de colónias identificadas como *Enterobacteriaceae*

A = nº de colónias seleccionadas para confirmação (pelo menos 5 ou todas as existentes)

C = nº total de colónias nas placas

Arredondar o resultado a um número inteiro.

Apresentar os resultados em número de unidades formadoras de colónias (N) em 1 g (N / g), multiplicando pelo factor de diluição correspondente.

3.5 Controlo de resultados

Acompanhar as sementeiras de controlos de esterilidade dos meios líquidos de cultura riscando com uma ansa de 10 µL em placa de um agar nutritivo.

Sempre que possível acompanhar as sementeiras e repicagens dos meios com controlos de esterilidade (uma placa ou tubo não inoculado de cada meio) e controlos positivos e negativos usando estirpes de referência de acordo com a seguinte tabela:

Meio de cultura	Controlo positivo	Controlo negativo
VRBGA	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
OF	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>

Pesquisa de bactérias Ácido –láticas (ISO 6887-1, 1999; ISO 6887-3, 2003; ISO 7218, 2007; ISO 15214 : 1998)

1. Objectivo e campo de aplicação

O procedimento descrito descreve o método analítico utilizado para a identificação e contagem de bactérias ácido-láticas.

2. Definição e resumo do processo

As bactérias ácido-láticas são um grupo de bactérias gram positivas, não patogénicas, que têm o ácido láctico como produto metabólico principal. Nestas bactérias estão incluídas as espécies *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* e *Pediococcus*.

O método baseia-se na sementeira por incorporação de diferentes diluições da amostra em meio de cultura MRS agar.

3. Modo operativo

3.1 Meios de cultura e reagentes

MRS broth , Merck Ref^a 1.10661.0500

MRS agar , Oxoid Ref^a CM0361

Estes meios encontram-se comercializados sob a forma desidratada e são preparados de acordo com as instruções do fabricante.

3.2 Aparelhos e utensílios

Material corrente em laboratório de microbiologia e nomeadamente:

Balança, sensível ao décimo de grama

Estufa de incubação, regulável a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$

Stomacher

Homogeneizador tipo vortex

3.3 Técnica

Efectua-se segundo adaptações das ISO 6887-1(1999), ISO 6887-3 (2003) e ISO 15214 (1998)

3.3.1. Preparação da suspensão mãe e diluições

Pesa-se 10 g da amostra para saco de homogeneizador stomacher e junta-se 90 ml de solução de MRS broth e homogeneiza-se em stomacher durante 45 s - 60 s à velocidade normal. Obtém-se deste modo a suspensão mãe (10^{-1}).

As diluições decimais seguintes são preparadas adicionando 1 ml da suspensão anterior a 9 ml de diluente (MRS broth). O número de diluições deve ser suficiente para obter até 150 colónias características.

3.3.2 Sementeira

Semeia-se 1 ml da suspensão-mãe e das seguintes diluições decimais em placas de Petri e inocula-se por incorporação o meio de cultura gelosado não selectivo MRS agar arrefecido a 45°C (aproximadamente 15 ml). Deixar solidificar.

Nota: Sempre que possível fazer inoculações em duplicado.

3.3.3 Incubação

As placas de petri são incubadas invertidas a $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $72\text{ h} \pm 2\text{ h}$.

3.3.4. Leitura

Depois do tempo especificado , contar as colónias em cada placa de Petri.

Contabilizar as colónias presentes em placas que tiverem menos de 300 colónias em duas diluições consecutivas, e mais do que 10 colónias em pelo menos uma das placas.

3.4. Resultados

Tratamento dos resultados feito com base na ISO 7218 (2007).

Para um resultado ser válido é necessário contar colónias em pelo menos uma placa contendo pelo menos 10 colónias. Calcular o número de microrganismos (N) presentes na amostra em duas diluições sucessivas de acordo com a seguinte equação (1):

$$N = \frac{\sum C}{V \times 1,1 \times d}$$

Onde:

$\sum C$ corresponde á soma das colónias contadas nas duas placas de diluições sucessivas onde, pelo menos numa, contém um mínimo de dez colónias;

V corresponde ao volume de inoculo em cada placa de Petri , expresso em ml;

d corresponde á diluição correspondente á primeira diluição contada.

O resultado é expresso com dois algarismos significativos.

Reportar o resultado como ufc/g.